



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## División de Ciencias Básicas e Ingeniería

### Unidad Iztapalapa

## TESIS

“Efecto del tratamiento combinado de albúmina con polímeros de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados vía energía de plasma en la recuperación motora después de una lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas Long - Evans”

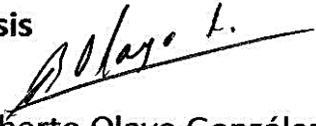
### Que presenta

M. en C. Omar Felipe Fabela Sánchez

### Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias  
(Ingeniería Biomédica)

### Directores de tesis

  
Dr. Roberto Olayo González

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

23 de marzo de 2018 en la Ciudad de México, México.

Ciudad de México a 06 de marzo de 2018

De acuerdo con los lineamientos establecidos por el posgrado en Ciencias en Ingeniería Biomédica y con la finalidad de obtener la aprobación para la impresión del trabajo de tesis:

***“Efecto del tratamiento combinado de albúmina con polímeros de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados vía energía de plasma en la recuperación motora después de una lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas Long - Evans”***

El jurado designado por la División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Unidad Iztapalapa, conformada por:

**Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

Presidente



**Dr. Pedro Díaz Leyva**

Secretario



**Dra. Sandra Adela Orozco Suárez**

Vocal



**Dr. Antonio Bueno Nava**

Vocal



**Dr. Rigoberto González Piña**

Vocal



Ha tenido a bien **APROBAR** la impresión y disertación pública del trabajo de tesis presentada por el **M en C. Omar Felipe Fabela Sánchez**.

**“Mucha gente pequeña,  
en lugares pequeños,  
haciendo cosas pequeñas,  
pueden cambiar el mundo”**

*Eduardo Galeano*

**“La adversidad despierta el talento  
que en la prosperidad  
hubiera permanecido durmiendo”**

*Horacio*

**“Mi grandeza no reside en no haber  
caído nunca, sino en haberme  
levantado siempre”**

*Napoleón Bonaparte*

El presente trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo en conjunto de ...

El **CONACyT** por el apoyo otorgado para el desarrollo de mis estudios y trabajos doctorales.

Las instituciones y profesores sin cuya asesoría este trabajo no llegaría a buen fin:

- § Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,
  - Dr. Roberto Olayo González, Dr. Juan Morales Corona, Dr. Humberto Vázquez Torres, Dr. José y T.H. Jorge Sepúlveda Sánchez.
- § Fundación IMSS / Proyecto Camina A.C.,
  - Dra. Hermelinda Salgado Ceballos.
- § Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares,
  - Dra. Guadalupe Olayo y Dr. Guillermo Cruz Cruz.
- § Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía,
  - Dra. Araceli Díaz Ruiz y Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.
- § Facultad de Química de la UNAM,
  - Dr. Luis Medina Torres.

por el apoyo económico, técnico y/o científico proporcionado para el desarrollo y conclusión de este trabajo de investigación.

Mis padres y hermanos (incluyendo a los amigos), quienes tuvieron a bien toda la paciencia del mundo para verme concluir esta meta en mi vida.

Los integrantes del grupo multidisciplinario de Biomateriales quienes dieron sus consejos y regaños.

El equipo de cirugía, que siempre tuvo un reto nuevo a vencer e hicieron de cada cirugía un grato recuerdo.

Por último, pero no por ello menos importante, a Gerry, por estar a mi lado y nunca dejarme caer durante las etapas más difíciles en este el camino.

*A todos Uds. muchas gracias por todo.*

## Tabla de contenido

FIGURAS.....	8
GRÁFICAS.....	10
TABLAS. ....	11
ABREVIATURAS. ....	12
SÍMBOLOS GRIEGOS .....	15
RESUMEN.....	16
ABSTRACT. ....	17
1. INTRODUCCIÓN. ....	18
2. ANTECEDENTES.....	21
2.1. <i>Biomateriales.</i> .....	22
2.2. <i>Modificación superficial de los biomateriales.</i> .....	24
2.3. <i>Síntesis de biomateriales vía energía de plasma.</i> .....	29
2.4. <i>Caracterización de biomateriales.</i> .....	31
2.4.1. <i>Pruebas superficiales en biomateriales.</i> .....	31
2.4.2. <i>Reología.</i> .....	33
2.4.2.1. <i>Pruebas de fluidos bajo cizalla simple.</i> .....	33
2.4.2.2. <i>Modelos matemáticos para fluidos bajo cizalla simple.</i> .....	37
2.4.2.3. <i>Pruebas de fluidos bajo cizalla oscilatoria.</i> .....	38
2.5. <i>Médula espinal.</i> .....	42
2.6. <i>Lesión traumática de la médula espinal (LTME).</i> .....	43
2.6.1. <i>LTME como problema Socio - Económico.</i> .....	43
2.6.2. <i>Fisiopatología en LTME.</i> .....	44
2.6.3. <i>Clasificación de la parálisis debido a LTME.</i> .....	47
2.6.4. <i>Estrategias diseñadas para el tratamiento de LTME.</i> .....	49
2.7. <i>Albumina de suero.</i> .....	50
2.7.1. <i>Estructura de la proteína de albúmina de suero.</i> .....	51
2.7.2. <i>Albumina de suero como transportador.</i> .....	55
2.7.3. <i>Actividad antioxidante y neuroprotectora de la albúmina de suero.</i> .....	55
2.8. <i>Biomateriales y tratamiento de lesiones en médula espinal.</i> .....	61
3. JUSTIFICACIÓN.....	66
4. HIPÓTESIS.....	68

<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1. Objetivo general. ....</b>	<b>71</b>
5.1.1. Objetivos particulares.....	71
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1. Reactivos.....</b>	<b>73</b>
<b>6.2. Síntesis de polímeros de Polipirrol dopado con Yodo vía energía de plasma.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3. Pruebas de caracterización fisicoquímicos.....</b>	<b>74</b>
6.3.1. Caracterización superficial de P1 y P2.....	74
6.3.2. Adsorción superficial de albúmina.....	75
<b>6.4. Pruebas de flujo.....</b>	<b>76</b>
<b>6.5. Pruebas in vivo. ....</b>	<b>77</b>
6.5.1. Lineamientos para pruebas in vivo con LTME.....	77
6.5.2. Cepa Long - Evans como modelo de LTME.....	77
6.5.3. Modelo de lesión traumática de médula espinal.....	77
6.5.4. Prueba de concentración de BSA en LTME moderada.....	79
6.5.5. Diseño experimental y microinyección de suspensiones de PPPy/I y RSA en LTME.....	79
6.5.6. Administración del tratamiento experimental.....	80
6.5.7. Evaluación funcional de los animales.....	80
6.5.8. Criterios de exclusión.....	81
<b>6.6. Pruebas ex vivo.....</b>	<b>81</b>
6.6.1. Estudios morfológicos.....	81
6.6.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	82
6.6.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	82
<b>6.7. Análisis gráfico y estadístico.....</b>	<b>83</b>
<b>7. RESULTADOS: CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA. ....</b>	<b>84</b>
<b>7.1. Análisis morfológico de P1 y P2.....</b>	<b>85</b>
<b>7.2. Espectroscopia infrarroja (FT-IR) de P1 y P2.....</b>	<b>86</b>
<b>7.3. Análisis elemental de P1 y P2.....</b>	<b>87</b>
<b>7.4. Adsorción de albúmina de suero bovina (BSA) sobre películas delgadas de P1 y P2.....</b>	<b>88</b>
<b>8. RESULTADOS: PRUEBAS DE FLUJO.....</b>	<b>90</b>
<b>8.1. Albúmina de suero bovina (BSA).....</b>	<b>91</b>
8.1.1. Estabilidad térmica de BSA.....	91
8.1.2. Cizallamiento simple de BSA.....	92
8.1.3. Cizalla oscilatoria de BSA.....	92
<b>8.2. Combinación de BSA y P1 o P2.....</b>	<b>93</b>

8.2.1.	<i>Cizallamiento simple de suspensiones combinadas.....</i>	93
8.2.2.	<i>Cizallamiento oscilatorio de suspensiones combinadas. ....</i>	95
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS: PRUEBAS <i>IN VIVO</i>. ....</b>	<b>97</b>
9.1.	<i>Prueba de concentración de albúmina en LTME moderada.....</i>	98
9.2.	<i>Suspensiones de PPPy/I con y sin RSA. ....</i>	99
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS: PRUEBAS <i>EX VIVO</i>. ....</b>	<b>101</b>
10.1.	<i>Resonancia magnética nuclear ex vivo.....</i>	102
10.2.	<i>Tinción de Lapham. ....</i>	103
10.3.	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM). ....</i>	104
<b>11.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>12.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>13.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>132</b>
<b>14.</b>	<b>PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN. ....</b>	<b>134</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>146</b>
	<b>GLOSARIO. ....</b>	<b>154</b>
	<b>APÉNDICE.....</b>	<b>161</b>
A.1.	<i>Métodos para el análisis superficial de biomateriales. ....</i>	162
A.2.	<i>Pares nerviosos. ....</i>	163
A.3.	<i>Escala Basso - Beattie – Bresnahan: Locomoción y funcionalidad en ratas. ....</i>	164
A.4.	<i>Formato de evaluación para la escala Basso - Beattie – Bresnahan. ....</i>	166
A.5.	<i>Solución fijadora de Karnosky. ....</i>	167
A.6.	<i>Tinción de Lapham de Floxina - Verde rápido para mielina y fibras gliales.....</i>	168
A.7.	<i>Estadísticos de regresión lineal ´para el ángulo de contacto en la región I.....</i>	169
A.8.	<i>Estadísticos de regresión lineal ´para el ángulo de contacto en la región II.....</i>	170
A.9.	<i>Estadísticos de regresión lineal ´para el ángulo de contacto en la región III. ....</i>	171
A.10.	<i>Estadísticos de grupos para prueba de concentraciones de albúmina. ....</i>	172
A.11.	<i>Estadísticos de grupo control sin LTME con microinyección. ....</i>	173
A.12.	<i>Estadísticos de grupos con LTME con microinyección. ....</i>	174
A.13.	<i>Composición de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). ....</i>	175

## FIGURAS.

FIG. 1. ESQUEMA GENERAL DE PRUEBAS DE BIOCMPATIBILIDAD. ....	23
FIG. 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE MODIFICACIÓN DE SUPERFICIAL DE BIOMATERIALES .....	25
FIG. 3. MODULACIÓN DE LA AFINIDAD DE UNIÓN DE INTEGRINAS Y FUERZA DE ADHESIÓN EN SUPERFICIES MODIFICADAS. ....	26
FIG. 4. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL PARA LA MODULACIÓN DE PROCESOS DE MINERALIZACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. ....	27
FIG. 5. REACCIÓN DE PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE POLIPIRROL – ALBÚMINA (ALB) .....	29
FIG. 6. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE BIOMATERIALES .....	32
FIG. 7. PARÁMETROS DETERMINADOS MEDIANTE ENSAYOS POR CIZALLA SIMPLE. ....	35
FIG. 8. COMPORTAMIENTO DE LA VISCOSIDAD DE UNA SOLUCIÓN POLIMÉRICA BAJO CIZALLAMIENTO SIMPLE .....	36
FIG. 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE RESPUESTA A UN ESFUERZO Y CIZALLA OSCILATORIO EN SISTEMAS ELÁSTICOS, VISCOSOS, Y VISCOELÁSTICOS .....	39
FIG. 10. RESPUESTA DE UN FLUIDO REAL SOMETIDO A CIZALLA OSCILATORIA.....	40
FIG. 11. FICHA TÉCNICA DE SOLUCIÓN DE HIALINOS PARA EL TRATAMIENTO DE DESGASTE ARTICULAR. ....	41
FIG. 12. ESQUEMA ANATÓMICO DE LA MÉDULA ESPINAL. ....	42
FIG. 13. PROGRESIÓN DE LTME DE 1 DÍA HASTA 14 SEMANAS. ....	45
FIG. 14. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE TRES LESIONES TÍPICAS DE LA MÉDULA ESPINAL .....	46
FIG. 15. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DIVERSOS GRADOS DE PARÁLISIS .....	47
FIG. 16. ORGANIZACIÓN DEL GEN Y ARNM PARA SA.....	51
FIG. 17. ORGANIZACIÓN MODULAR DE LOS DOMINIOS EN LA ALBÚMINA.....	53
FIG. 18. ÁRBOL CLADOGRAMA DE LAS SECUENCIAS DE 50 ALBÚMINA DE SUEROS.....	54
FIG. 19. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PÉPTIDO DAHK Y SU SITIO DE ACCIÓN QUELANTE. ....	56
FIG. 20. MICROFOTOGRAFÍA QUE MUESTRA EL EFECTO ANTIOXIDANTE DE HSA ANTE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	56
FIG. 21. MICROCIRCULACIÓN DESPUÉS DE 1 H DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CON FTCl - BSA. ....	59
FIG. 22. HISTOPATOLOGIA DE UNA LESIÓN ISQUÉMICA CEREBRAL TRATADA CON DHA - SA.....	60
FIG. 23. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MOTORA MEDIANTE ESCALA BBB EN RATAS CON LTME.....	61
FIG. 24. SISTEMA DE LIBERACIÓN INTRATECAL DE BIOMOLÉCULAS ACTIVAS.....	62
FIG. 25. MICROGRAFÍA DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE POLÍMEROS DE POLIPIRROL.....	63
FIG. 26. FOTOGRAFÍAS Y CORTES HISTOLÓGICOS CON O SIN IMPLANTE EN LSCME. ....	64
FIG. 27. CORTES HISTOLÓGICOS DE MÉDULA ESPINAL A 2 MESES DE LTME CON TRATAMIENTO DE MESOPARTÍCULAS DE PPPy/I Y REHABILITACIÓN FÍSICA. ....	65
FIG. 28. PROCESO DE SÍNTESIS DE PPPy/I.....	74
FIG. 29. ANÁLISIS DE ÁNGULO DE CONTACTO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE UN LÍQUIDO A EXTENDERSE SOBRE UNA SUPERFICIE. ....	75

---

FIG. 30. CONFIGURACIÓN PARA ESTUDIOS REOLÓGICOS. ....	76
FIG. 31. PROCESO DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL MEDIANTE NYU IMPACTOR. ....	78
FIG. 32. MICROINYECCIÓN DE TRATAMIENTO. ....	80
FIG. 33. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE POLVOS DE POLIPIRROL DOPADO CON YODO SINTETIZADOS POR PLASMA (PPPy/I). ....	85
FIG. 34. DIFERENTES REPRESENTACIONES DE LA ESTRUCTURA HETEROCÍCLICA DEL PIRROL. ....	88
FIG. 35. IMÁGENES ÓPTICAS Y POR RMN <i>POST MORTEM</i> DE MÉDULAS ESPINAL DE ANIMALES EXPERIMENTALES. ....	102
FIG. 36. SECCIONES DE MÉDULA ESPINAL CON TINCIÓN DE LAPHAM O MÉTODO LA FLOXINA - VERDE RÁPIDO PARA MIELINA Y LAS FIBRAS GLIALES (2.5x). ....	103
FIG. 37. IMÁGENES SEM DE LTME CON Y SIN IMPLANTE DE PPPy/I. ....	104
FIG. 38. VALORES DE REFERENCIA PARA ÁNGULOS DE CONTACTO CARACTERÍSTICOS PARA GRUPOS FUNCIONALES SUPERFICIALES. TOMADO DE (85) ....	109
FIG. 39. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ADSORCIÓN DE BSA EN LA SUPERFICIE DE PPPy/I. ....	110
FIG. 40. REPRESENTACIÓN DE LAS INTERACCIONES PRESENTES EN LAS SUSPENSIONES DE PARTÍCULAS PPPy/I EN SOLUCIONES DE BSA. .	116
FIG. 41. RECONSTRUCCIÓN DE IMÁGENES DE RMN DE MÉDULAS <i>EX VIVO</i> , CORRESPONDIENTE A LA EXTENSIÓN DEL DAÑO EN FORMA VOLUMÉTRICA A LO LARGO DE LA MÉDULA ESPINAL ....	127
FIG. 42. AMPLIFICACIÓN DE IMÁGENES OBTENIDAS POR SEM DE MÉDULA ESPINAL DEL GRUPO LTME + P1 + RSA. ....	128

## GRÁFICAS.

GRAF. 1. BANDAS EN EL ESPECTRO INFRARROJO DE P1 Y P2.....	86
GRAF. 2. ESPECTRO DE LA MEDICIÓN DE ENERGÍA DE ENLACE ELEMENTAL POR XPS EN PARTÍCULAS DE PPPy/I. ....	87
GRAF. 3. ÁNGULO DE CONTACTO DE AGUA SOBRE PELÍCULAS DE PPPy/I EXPUESTAS A BSA. ....	89
GRAF. 4. COMPORTAMIENTO DE LA VISCOSIDAD DE BSA EN BARRIDO DE TEMPERATURA BAJO CIZALLAMIENTO SIMPLE.....	91
GRAF. 5. COMPORTAMIENTO VISCOSO DE BSA BAJO CIZALLAMIENTO SIMPLE.....	92
GRAF. 6. CURVAS DE CIZALLAMIENTO OSCILATORIO DE BSA A 25 Y 37 °C. ....	93
GRAF. 7. COMPORTAMIENTO VISCOSO DE SUSPENSIONES DE PPPy/I EN BSA BAJO CIZALLAMIENTO SIMPLE.....	94
GRAF. 8. CURVAS DE CIZALLAMIENTO OSCILATORIO DE PPPy/I PARA 0 Y 7 MG/ML BSA. ....	95
GRAF. 9. CURVAS DE CIZALLAMIENTO OSCILATORIO DE P1 Y P2 A 14 Y 21 MG/ML BSA. ....	96
GRAF. 10. TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BSA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL POST LTME. ....	98
GRAF. 11. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONAL MOTORA POST TRATAMIENTOS CON P1, P2 O RSA SIN LTME. ....	99
GRAF. 12. RECUPERACIÓN FUNCIONAL MOTORA POST TRATAMIENTO CON PPPy/I Y/O RSA. ....	100
GRAF. 13. ANÁLISIS POR DECONVOLUCIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS AL CARBONO. ....	108
GRAF. 14. REGIÓN I: FORMACIÓN DE MONOCAPA DE BSA SOBRE PPPy/I. ....	112
GRAF. 15. REGIÓN II: FORMACIÓN DE MULTICAPAS DE BSA SOBRE PPPy/I.....	114
GRAF. 16. REGIÓN III: ESTADO ESTACIONARIO DE MULTICAPAS DE BSA SOBRE PPPy/I. ....	115
GRAF. 17. AJUSTE AL MODELO DE CROSS PARA SOLUCIONES DE BSA BAJO CIZALLAMIENTO SIMPLE. ....	118
GRAF. 18. AJUSTE AL MODELO DE CROSS PARA SUSPENSIONES DE PPPy/I A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BSA EN SOLUCIÓN. ....	119
GRAF. 19. COMPARACIÓN GLOBAL DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL POST LTME CON Y SIN TRATAMIENTO CON BSA. ....	123
GRAF. 20. COMPARATIVO DE LA MEDIA DE LOS GRUPOS LTME CON TRATAMIENTO. ....	125

## TABLAS.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN BIOMATERIAL. ....	22
TABLA 2. CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS BIOMATERIALES DE ACUERDO CON SU NATURALEZA .....	23
TABLA 3. PRUEBAS DE HEMOCOMPATIBILIDAD DE DERIVADOS DE POLIPIRROL ACERO QUIRÚRGICO .....	28
TABLA 4. BREVE HISTORIA DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL MEDIANTE SÍNTESIS POR PLASMA .....	30
TABLA 5. TIPO DE REOLÓGICO DE INTERÉS CIENTÍFICO E INDUSTRIAL.....	33
TABLA 6. CLASIFICACIÓN GENERAL DE FLUIDOS NO NEWTONIANOS. ....	36
TABLA 7. MODELOS MATEMÁTICOS DE APLICACIÓN REOLÓGICA.....	37
TABLA 8. RESPUESTA DE UNA MUESTRA EN CIZALLA OSCILATORIA.....	38
TABLA 9. CONSECUENCIA DEL NIVEL EN QUE SE REALICE UNA LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL .....	48
TABLA 10. ESTRATEGIAS DISEÑADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LTME. ....	49
TABLA 11. SUBSTANCIAS ENDÓGENAS Y EXÓGENAS ACARREADAS POR LA ALBÚMINA.....	50
TABLA 12. COMPONENTES PROTEICOS EN LA FRACCIÓN INTRATECAL DEL FLUIDO CEREBROESPINAL EN CONDICIONES NORMALES.....	58
TABLA 13. GRUPOS PARA PRUEBA DE CONCENTRACIÓN DE BSA. ....	79
TABLA 14. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA PRUEBA DE ALBÚMINA Y POLÍMERO EN LTME.....	79
TABLA 15. ANÁLISIS ELEMENTAL EN PORCENTAJE (%) ATÓMICO POR XPS PARA P1 Y P2. ....	88
TABLA 16. REGIONES ESTABLECIDAS POR LA INTERACCIÓN DE BSA CON PPPy/I. ....	89
TABLA 17. VALORES CRÍTICOS DE LA REGIÓN I .....	112
TABLA 18. VALORES CRÍTICOS DE LA REGIÓN II .....	114
TABLA 19. VALORES ESTACIONARIOS DE LA REGIÓN III .....	115
TABLA 20. VALORES DE $\eta_0$ Y PENDIENTE PARA BSA ESTIMADOS CON EL MODELO DE CROSS.....	118
TABLA 21. VALORES DE $\eta_0$ Y PENDIENTE PARA SUSPENSIONES DE PPPy/I EN BSA ESTIMADOS CON EL MODELO DE CROSS. ....	120

---

## ABREVIATURAS.

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A-AH	Aldehído – ácido hialuronico
AC	Ángulo de contacto
ALB	Albúmina
ATR	Refracción total atenuada
BBB	Escala Basso – Beattie – Bresnahan
BSA	Albúmina de suero bovino
CM	Ciencia de materiales
DAHK	Péptido de Aspartato – Alanina -Histidina - Lisina
DAPI	4', 6 – diamidino – 2 – fenil - indol
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fig.	Figura
FN	Fibronectina
FT - IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
G´	Módulo elástico o viscoso
G´´	Módulo de pérdida o almacenamiento
GFAP	Proteína ácida fibrogliar
Graf.	Gráfica
IT	Ingeniería de tejidos
LTME + P + RSA	Rata con Lesión + Polipirrol + Albúmina de suero de rata

---

LCR	Líquido cefalorraquídeo
LSCME	Lesión por sección completa de médula espinal
LTME	Lesión traumática de médula espinal
MC3T3	Línea celular de osteoblastos derivada de <i>Mus musculus calvaria</i>
ME	Médula espinal
MEC	Matriz extracelular
MP	Mesopartículas
P1	Polipirrol dopado con Yodo sintetizado por plasma sin agua
P2	Polipirrol dopado con Yodo sintetizado por plasma más agua
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PGCS	Proteoglicano condroitín sulfato
PGKS	Proteoglicano queratán sulfato
PPPy/I	Polipirrol dopado con Yodo sintetizado vía plasma
PPy – NSE	Polipirrol – N – succinil – éster
PPy – NSE – BSA	Polipirrol – N – succinil – éster –albúmina de suero bovino
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSA	Albúmina de suero de rata
S – CS	Succinil – quitosano
SA	Albúmina de suero
SAM	Moléculas autoensamblables
SEM	Microscopía electrónica de barrido

---

SRF	Radio frecuencia de superconducción
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGF	Factor de crecimiento transformante
Torr	Unidad de medida de presión equivalente a 0.999 mmHg
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

## SÍMBOLOS GRIEGOS

$\theta$	Ángulo de contacto.
$\lambda$	Constante de tiempo
$\alpha$	Exponente adimensional de la ley de potencias
$\omega$	Frecuencia de oscilación (rad/s)
$\eta_{\infty}$	Viscosidad a altos cortes (Pa*s)
$\dot{\gamma}$	Velocidad de cizallamiento (1/s)
$\eta$	Viscosidad aparente (Pa*s)
$\eta_0$	Viscosidad a bajos cortes (Pa*s)

---

## RESUMEN.

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un problema de salud para el cual actualmente no existe un tratamiento o terapia efectiva. La medicina ha explorado las diversas opciones terapéuticas para pacientes con LTME con el objetivo de mejorar su calidad de vida. Una alternativa ha sido el desarrollo de biomateriales que ofrecen neuroprotección o neuroregeneración del tejido nervioso dañado. La microinyección de partículas de Polipirrol dopadas con Yodo sintetizado por plasma (PPPy/I) ha demostrado efectos neuroprotectores que favorecen la recuperación de la función motora en animales experimentales con LTME. Sin embargo, su capacidad para migrar en el tejido ha llevado a la necesidad de probar un vehículo de suspensión que permite la concentración de partículas en el sitio de la lesión. Para lograr esto, se estudiaron biomateriales de PPPy/I variando la condición de presencia o ausencia de agua en el proceso de síntesis, a los polímeros obtenidos se denominaron como P1 y P2. La caracterización fisicoquímica de la superficie de los polímeros se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja (FT – IR), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y ángulo de contacto (AC). Asimismo, se estudió el desempeño reológico de suspensiones que contienen ambos polímeros solos y en combinación con albúmina de suero bovina (BSA). Se realizaron ensayos *in vivo* en animales con y sin LTME moderada que se microinyectaron con partículas de P1 o P2 en suspensión usando una solución de suero de albúmina de rata (RSA). Se observó que la exposición a soluciones de proteínas genera una multicapa proteica en la superficie de los biomateriales que modificó drásticamente el comportamiento tanto de P1 como de P2, lo que generó serias repercusiones en los ensayos *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que la química de la superficie juega un papel importante en el desempeño global de los biomateriales y que es posible tratar la LTME moderada con estos materiales.

## ABSTRACT.

Traumatic spinal cord injury (TSCI) is a health problem for which there is currently no treatment or effective therapy. Medicine has explored therapeutic options for patients with TSCI with the aim to improve their quality of life. One alternative has been the development of biomaterials that offer neuroprotection or neuroregeneration of damaged nerve tissue. The microinjection of iodine-doped polypyrrole particles synthesized by plasma (PPPy/I) has shown neuroprotective effects that favour motor function recovery in experimental animals with TSCI. However, their ability to migrate into the tissue has led to the need to test a suspension vehicle that enables the concentration of particles at the site of injury. To achieve this, two biomaterials of PPPy/I were studied by varying the condition of presence or absence of water in the synthesis process, the polymers obtained were designated as P1 and P2. The superficial physicochemical characterization of the polymers was performed by infrared spectroscopy (FT – IR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and contact angle (AC). Likewise, the rheological performance of suspensions containing both polymers alone and in combination with bovine serum albumin was also studied. In vivo tests were performed on animals with and without moderate TSCI that were microinjected with particles of P1 or P2 in suspension using a solution of rat serum albumin. It was observed that exposure to the protein solutions generates a protein multilayer on the surface of the biomaterials that can drastically change the behaviour of both P1 and P2, which led to severe repercussions in the *in vivo* assays. The results showed that surface chemistry plays an important role in the global performance of biomaterials and that it is possible to treat moderate TSCI with these materials.

# **1. INTRODUCCIÓN.**

En las últimas décadas, la medicina, así como las diferentes áreas del conocimiento que la componen, han desarrollado grandes avances técnicos – científicos con los cuales ha sido posible restaurar o mejorar las funciones de órganos y tejidos lesionados por enfermedad o traumatismo. En este sentido, la ciencia de los materiales incide en este campo al desarrollar materiales capaces de interactuar con sistemas vivos en sus diferentes grados de complejidad, lo cual permite realizar cultivos celulares y en un futuro llegar hasta a organismos vivos completos; a este tipo de materiales se les denomina biomateriales.

Los biomateriales pueden ser sencillos o complejos de acuerdo con la naturaleza con la que sean requeridos, sin embargo, previo a un uso clínico, estos deben someterse a pruebas que garanticen su inocuidad y biocompatibilidad una vez colocado en el sitio de interés; para ello, se requiere una serie de pruebas que permitan caracterizar sus propiedades físicas, químicas y biológicas con las cuales se tenga la certeza de que el biomaterial funcionara para la aplicación específica.

Uno de los problemas abordados por la medicina regenerativa a través del uso de biomateriales, es la recuperación de la capacidad motora tras haber sufrido una lesión traumática en la médula espinal (LTME).

En particular las aplicaciones de Polipirrol dopado con Yodo sintetizado por plasma (PPPy/I) (1) en sistemas biológicos han presentado resultados favorables como andamio para el crecimiento de células nerviosas en cultivos *in vitro* (2, 3), asimismo, en el tratamiento de LTME suministrando el PPPy/I como una pastilla implantada en modelo de sección completa (4, 5) o en suspensión por microinyección en el sitio de lesión en trauma por contusión (6), de estas opciones, la microinyección representa la técnica menos invasiva y traumática tanto para el tejido como para el huésped.

No obstante, en pruebas realizadas por Álvarez-Mejía y cols. (6) se observó histológicamente que el suministro por microinyección propicia una dispersión del biomaterial más allá del sitio de lesión. Una solución a ello es sacar provecho a las características de la química superficial de PPPy/I que le permiten interactuar con diversas proteínas, entre ellas la proteína

albúmina de suero, para con ello obtener un vehículo de administración, que, bajo ciertas condiciones, se comporte tal y como lo haría un sólido.

La proteína albúmina de suero, es una biomolécula de gran interés biotecnológico debido a sus particulares características biológicas involucradas en el transporte de nutrientes y fármacos, regulación de pH, presión osmótica fisiológica, acción de agente quelante (7-9) y neuroprotector (10, 11), entre otras. Previamente, algunas de estas propiedades han sido aprovechadas para obtener fluidos estructurados o sistemas semisólidos con estructuras multifase (12) por diferentes ramos industriales con fines comerciales.

El presente trabajo se enfocó en determinar las características fisicoquímicas de PPPy/I bajo dos síntesis diferentes, el comportamiento reológico que estos presentan al ser suspendidos como polvo en soluciones de albúmina de suero para obtener un sistemas PPPy/I + Albúmina capaces de presentar estructuración semejante a un sólido a bajos cortes de cizallamiento, tal como se pueden esperar en el epicentro de una LTME; además de la evaluación de estas suspensiones al microinyectarse en un modelo de LTME por contusión moderada determinando el grado de recuperación motora post tratamiento.

## **2. ANTECEDENTES.**

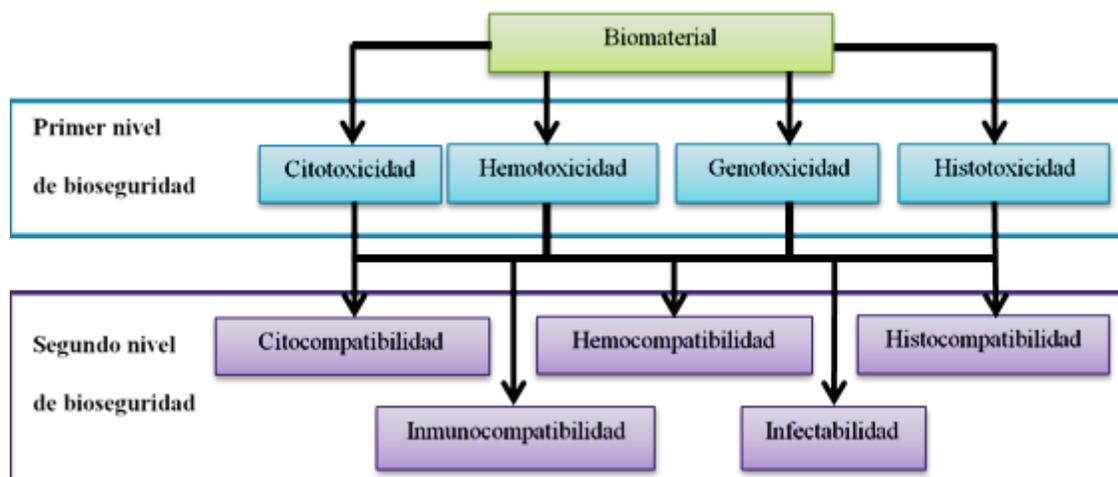
## 2.1. Biomateriales.

El término biomaterial es utilizado para designar a aquellos materiales que forman parte de los implantes médicos, dispositivos extra corporales y desechables que se han utilizado en atención a la salud. Boretos y Eden en 1984 en la National Institutes of Health Consensus Development Conference definieron al biomaterial como "cualquier sustancia diferente a un fármaco o combinación de sustancias de origen natural o sintético, que pueden ser utilizados como un todo o parte de un sistema en el tratamiento, aumento, o remplazo de cualquier tejido, órgano o función del cuerpo". Sin embargo, el común denominador en todas las definiciones que se han propuesto para biomateriales es el reconocimiento de que éstos se distinguen de otra clase de materiales debido a los criterios especiales que deben de cumplir en términos de biocompatibilidad (Fig. 1) y ciertas características fisicoquímicas generales (Tabla 1) (13-15).

**Tabla 1. Características ideales de un biomaterial.**  
(Tomado de (16))

<b>Biocompatible</b>
<b>Sin ningún tipo de reacción biológica adversa.</b>
<b>Reabsorbible (en algunos casos).</b>
<b>Tasa de degradación paulatina a medida que se forma el nuevo tejido.</b>
<b>Productos de degradación fácilmente eliminables e inocuos.</b>

En cuanto a su desempeño, los biomateriales se pueden clasificar de diversas maneras. En primer lugar, pueden ser considerados desde el punto de vista del problema por resolver; en segundo lugar, considera al huésped en niveles tales como tejidos, órgano o sistema; y en tercer lugar, tomar en cuenta su origen ya sea como metales, cerámicas, materiales compuestos y/o polímeros (Tabla 2), a partir de cualquiera de estos puntos de vista, en la aplicación del biomaterial se debe analizar su función estructural, composición química, funciones eléctricas y muchas otras características implicadas en su desempeño óptimo (15, 17).



**Fig. 1. Esquema general de pruebas de biocompatibilidad.**

Esquema de pruebas comúnmente realizadas para la aprobación en el uso de un biomaterial como implante (Tomado de (13)).

**Tabla 2. Clasificación general de los biomateriales de acuerdo con su naturaleza (Tomado de (17)).**

Material	Descripción
<b>Metálicos</b>	Uso casi exclusivo para implantes sometidos a esfuerzos mecánicos y corrosión, como prótesis para rodilla y cadera, clavos, tornillos y placas para fijación de fracturas.
<b>Cerámicos</b>	De composiciones inorgánicas y no metálicas, biocompatibles, no sufren los efectos de corrosión y, aunque algunos pueden llegar a degradarse, los productos de tal degradación pueden ser reabsorbidos.
<b>Compuestos o Compósito</b>	Constan al menos de dos fases distintas, separadas por una interfaz definida. El constituyente continuo que, por lo general, aunque no siempre, es el más abundante, se denomina matriz, dependiendo de ella se pueden clasificar en compuestos de matriz cerámica, metálica o polimérica.
<b>Poliméricos</b>	Estos materiales se utilizan en dispositivos donde se requiere resistencia mecánica y flexibilidad. Sus productos de degradación se eliminan principalmente a través del metabolismo celular. De forma general, se pueden clasificar como polímeros lineales, geles o resinas macro reticuladas.

## **2.2. Modificación superficial de los biomateriales.**

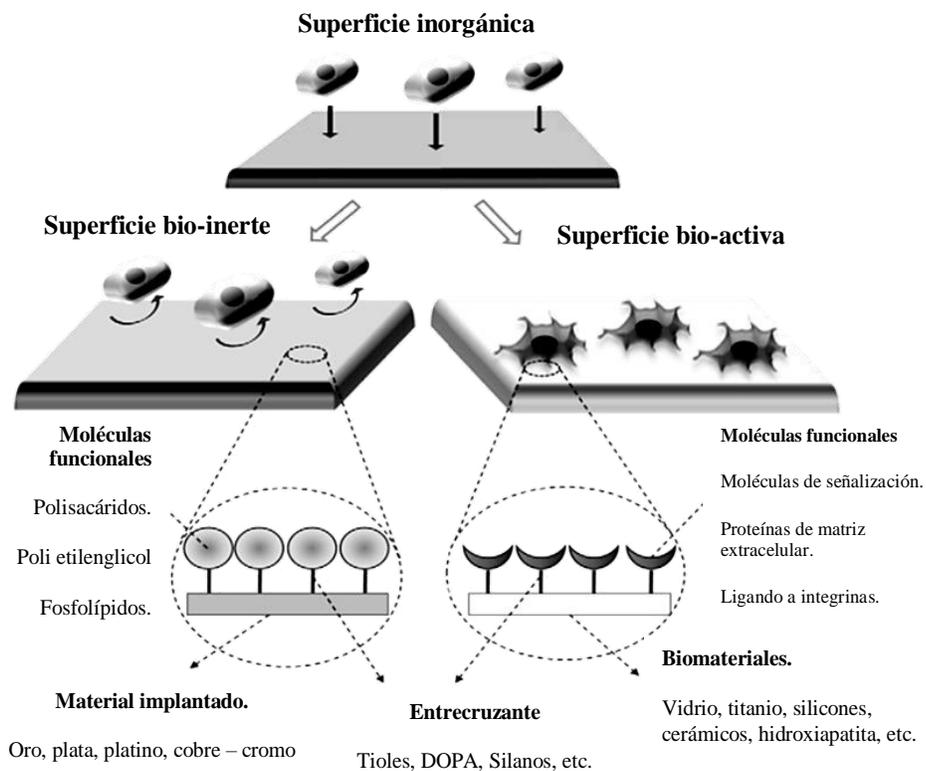
A pesar de que el desarrollo y aplicación de biomateriales goza hoy día de un gran interés, su existencia es tan antigua como la medicina misma. La utilización de biomateriales poliméricos naturales con fines médico – quirúrgicos se remonta a unos cuatro mil años en que ya se utilizaban como elementos de sutura. Sin embargo, no es sino hasta 1930 cuando inicia el gran desarrollo de las familias de polímeros que en relativamente poco tiempo llegaron a inundar todos los mercados; de tal forma que, en años recientes, el enfoque de la ingeniería de tejidos (IT) y la CM ha ido en la dirección de la aplicación combinatorio de materiales sintéticos y naturales para restaurar las funciones de los tejidos deteriorados. No obstante, la insuficiente o inadecuada interacción entre el biomaterial y el sistema vivo siguen siendo una preocupación importante, ya que a menudo el implante resulta en un fracaso en términos de biocompatibilidad (13, 18, 19).

A partir del continuo desarrollo de la industria de polímeros, se ha dispuesto de una serie de monómeros y con ello se inició la aplicación del concepto de funcionalización de polímeros, es decir, el proceso químico mediante el cual se incorporan grupos funcionales reactivos a una cadena polimérica. Por lo tanto, la modificación de las propiedades superficiales con base en una funcionalización de la misma se puede justificar de la siguiente forma: mantener las propiedades físicas más importantes del biomaterial, mientras que sólo se modifica la capa más externa para influir en la biointeracción, de tal manera que, si la modificación de la superficie es adecuada, las propiedades mecánicas y funcionales no se modificarán, pero el desempeño biológico se mejorará (17, 20-23).

De esta manera, la estrategia más común para mejorar la biocompatibilidad de los biomateriales ha sido su modificación superficial con moléculas orgánicas o embeberlos en redes complejas que permiten mantener las características superficiales de interés. Dichas moléculas se seleccionan generalmente para realizar una de dos funciones: generar superficies citocompatibles, es decir, que favorezcan la adhesión de células específicas o superficies antiadherentes para evitar la adherencia de proteínas y/o células (Fig. 2). Con este objetivo,

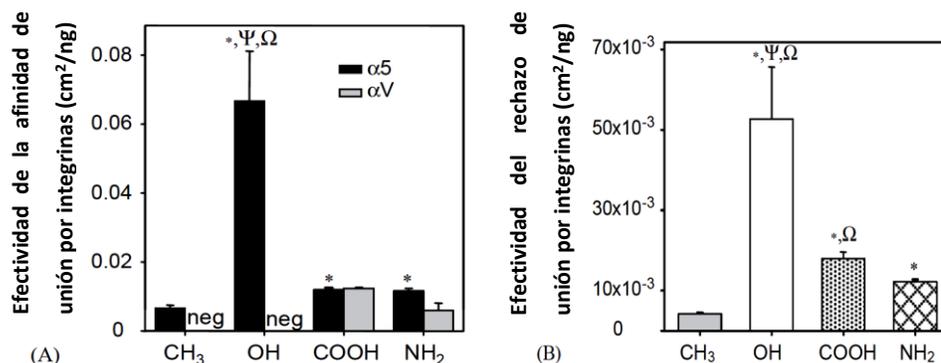
diversas moléculas inmovilizadas se han empleado con éxito para modificar las superficies de biomateriales implantables. Algunas estrategias de modificación superficial con moléculas funcionales incluyen la adsorción no específica, injerto fotoquímico, monocapa autoensamblables (SAM, por sus siglas en inglés), unión covalente y depósito por energía de plasma, entre otros.

Por ejemplo, la modificación de superficies por inmovilización de biomoléculas como el péptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), han mostrado un marcado aumento en la adhesión celular en cultivos *in vitro*. (20, 22, 24-26).



**Fig. 2. Representación esquemática de modificación de superficial de biomateriales (Tomado de (20)).**

Keselowsky y cols. (24) analizaron los efectos de la modificación superficial de partículas de oro al funcionalizarlas con 1 dodecanotiol ( $HS - (CH_2)_{11} - CH_3$ ), 11-mercapto-1-undecanol ( $HS - (CH_2)_{11} - OH$ ), ácido 11-mercapto-undecanoico ( $HS - (CH_2)_{10} - COOH$ ) y 12-amino-1-mercaptododecano ( $HS - (CH_2)_{12} - NH_2$ ); obteniendo SAM's las cuales presentaron un efecto sobre moléculas de adhesión celular (Fig. 3.), para ello cultivaron la línea celular MC3T3 en conjunto con estas SAM's recubiertas con fibronectina humana (FNh); observando un efecto sobre el proceso de mineralización de la MEC de dicha línea celular en un proceso semejante al realizado por osteoblastos (Fig. 4).

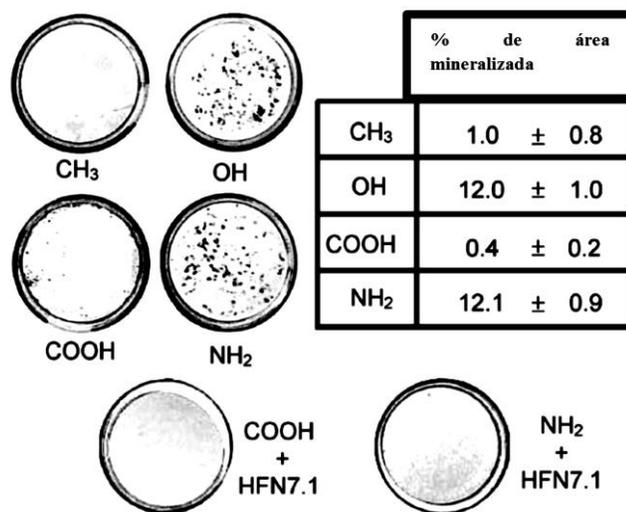


**Fig. 3. Modulación de la afinidad de unión de integrinas y fuerza de adhesión en superficies modificadas.**

Línea celular MC3T3 – E1 sembrada en medio libre de suero por 1 hora complementado con FNh-SAM's. (A) Efectividad de la afinidad de unión de las integrinas subunidad  $\alpha_5$  y  $\alpha_V$  a FN-SAM's. La subunidad  $\alpha_V$  no presentó unión a los grupos CH<sub>3</sub> y OH. (B) Efectividad de rechazo a la adhesión celular a FNh – SAM's. La comparación por pares mostró diferencias significativas dependiendo del grupo funcional expuesto (\*  $v_s$  CH<sub>3</sub>;  $\psi v_s$  COOH;  $\Omega v_s$  NH<sub>2</sub>;  $p < 0.05$ ) (Tomado de (24)).

Por otro lado, el pirrol es uno de los monómeros más ampliamente utilizados en la preparación de cubiertas poliméricas electro - conductoras de utilidad biomédica. Dicho

monómero ofrece grandes ventajas tales como disponibilidad, estabilidad química y capacidad de polimerizar que permite una fácil preparación de diversos derivados de pirrol así como la modificación superficial con grupos funcionales específicos para llevar a cabo la inmovilización de biomoléculas, ya sea por **(i) inclusión de biomoléculas** en una biopelícula en el momento de síntesis mediante una mezcla de monómero - biomolécula, pero la desnaturalización de las biomoléculas es un gran inconveniente, **(ii) unión electrostática de biomoléculas** directamente con grupos específicos generados en la superficie del polímero, lo que constituye un método conveniente para inmovilizar proteínas; sin embargo, el mayor inconveniente de este método son las fuerzas de interacción y/o los cambios en la fuerza iónica, que son dependiente del pH de la solución circundante que pueden causar la liberación de la fracción proteica, por último, **(iii) unión covalente de las biomoléculas** a grupos reactivos (amino o carboxilo) (21, 27).



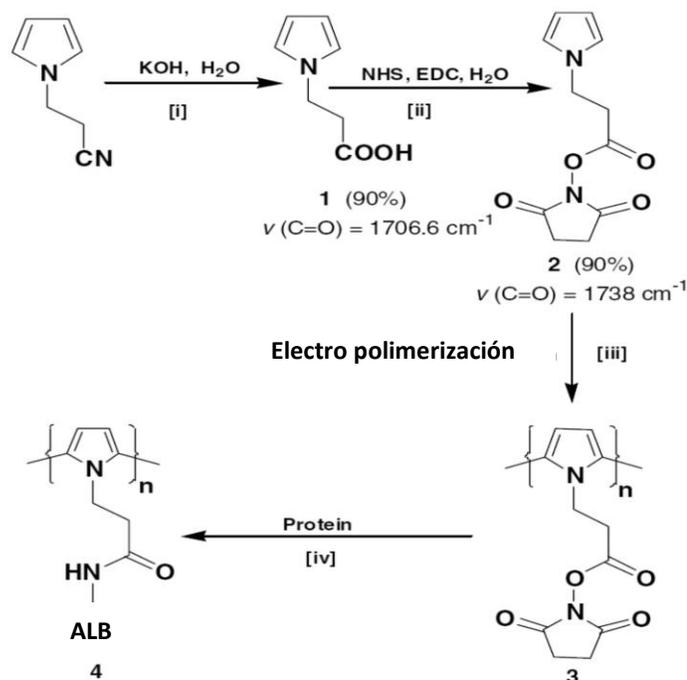
**Fig. 4. Modificación superficial para la modulación de procesos de mineralización de la matriz extracelular.**

Línea células MC3T3 - E1 cultivada en SAM's recubiertas con FN equivalentes 40 ng/cm<sup>2</sup>. Se observó la variación de los depósitos mineralizados (puntos negros) a los 12. El bloqueo con el anticuerpo HFN7.1, específico para FN humana, demostró que la unión de integrinas a FN pre-adsorbida es esencial para la diferenciación celular (Tomado de (24)).

En este sentido, Khan y cols. (21) reportaron la síntesis y caracterización del polímero N – succinil éster funcionalizado con Polipirrol (PPy - NSE, Fig. 5) con el cual recubrieron barras de acero (316L), seguido de una cobertura por adición covalente de albúmina de suero bovina (BSA), dicha proteína fue seleccionada debido a su abundancia en el organismo para evaluar la estabilidad de la BSA y la biocompatibilidad del material recubierto. Sus estudios sugieren que existe un límite máximo de absorción de BSA a una concentración próxima a 1000 µg/mL, en consecuencia, los resultados de las pruebas de hemólisis, formación de trombos y adhesión de plaquetas demostraron una mayor biocompatibilidad posterior a la cobertura con el material PPy – NSE - BSA, en comparación con aquellas que fueron cubiertas únicamente con PPy – NSE (Tabla 3).

**Tabla 3. Pruebas de hemocompatibilidad de derivados de Polipirrol acero quirúrgico (Tomado de (21)).**

Muestra	Densidad óptica	% de hemólisis
Control positivo	0.743	100.00
Control negativo	0.037	0.00
Barra de acero	0.073	5.03
PPPy–NSE	0.064	3.86
PPPy–NSE–AB	0.047	1.32



**Fig. 5. Reacción de preparación de derivados de Polipirrol – albúmina (ALB)**  
(Tomado de (21)).

### 2.3. Síntesis de biomateriales vía energía de plasma.

Las primeras investigaciones en el campo de polímeros fueron realizadas con la finalidad de obtener materiales sintéticos no reactivos o inertes, los cuales fueron obtenidos por polimerización de monómeros del tipo vinílico, con uno o más centros insaturados. Sus características están directamente relacionadas con las fuerzas interactuantes entre las cadenas lineales, ramificadas o entrecruzadas. Mientras que, la mayoría de los polímeros se sintetizan a través de reacciones clásicas, como adiciones vinílicas, esterificaciones, amidaciones, entre otras; los nuevos biomateriales requieren de estrategias y técnicas de síntesis innovadoras (17).

Desde 1960 a la fecha (Tabla 4), la técnica de polimerización por plasma había sido explorada por la industria de la electrónica, y no fue sino hasta la década de los 80's que dicha técnica fue implementada con fines biomédicos, teniendo en cuenta que una de sus ventajas es

la formación de películas con espesor controlado a diferentes condiciones de polimerización tales como potencia eléctrica de entrada, tiempos de polimerización y ciclos de trabajo sobre diversos sustratos, así como que el producto polimérico obtenido no requiere de purificaciones posteriores al no existir subproductos de síntesis. Para comprender un poco más respecto a la naturaleza de la polimerización por plasma, se debe entenderse que éstas se lleva a cabo dentro de un campo eléctrico que ioniza los gases de monómeros y de ser requerido cualquier otro agente dopante hasta un estado físico de plasmas, los monómeros ionizados incrementan la energía cinética de sus enlaces de tal manera que los monómeros pueden unirse entre ellos a través de la sustitución de átomos de hidrógeno; por ello, esta técnica es considerada no contaminante debido a que no recurre al uso de sustancias químicas adicionales para llevar a cabo la polimerización, dado que todas las especies químicas involucradas en el proceso de síntesis derivan del propio monómero; por lo tanto, sustancias químicas contaminantes que pudiesen generar una respuesta inflamatoria son técnicamente eliminadas del sistema de polimerización (4, 27-30).

**Tabla 4. Breve historia de la modificación superficial mediante síntesis por plasma**  
Adaptado de (28, 29).

Década	Suceso
1930's	Desarrollo de fuentes de baja energía de ionización.
1940's	Desarrollo de sistemas de mayor aceleración para iones ligeros.
1960's	Se llevan a cabo importantes esfuerzos para estudiar los efectos del ingreso de agentes dopantes en materiales semiconductores
1970's	Fabricación y venta al por mayor de dispositivos micro electrónicos silicio - plasma; mayores esfuerzos de investigación para estudiar la modificación superficial de metales.
1980's	Dopaje vía plasma como una técnica de uso en la industria de la microelectrónica; componentes biomédicos modificados por plasma se introducen al mercado.
1990's	Se incrementa la investigación y aplicación del plasma a una gran variedad de dispositivos biomédicos: ortopédicos: rodilla, dientes, hueso, tornillos pediculares, instrumental quirúrgico, etc.
2000's	Investigación y aplicación de la polimerización por plasma en la fabricación de componentes semiconductores dopados para el estudio en el tratamiento de la lesión de la médula espinal.

## **2.4. Caracterización de biomateriales.**

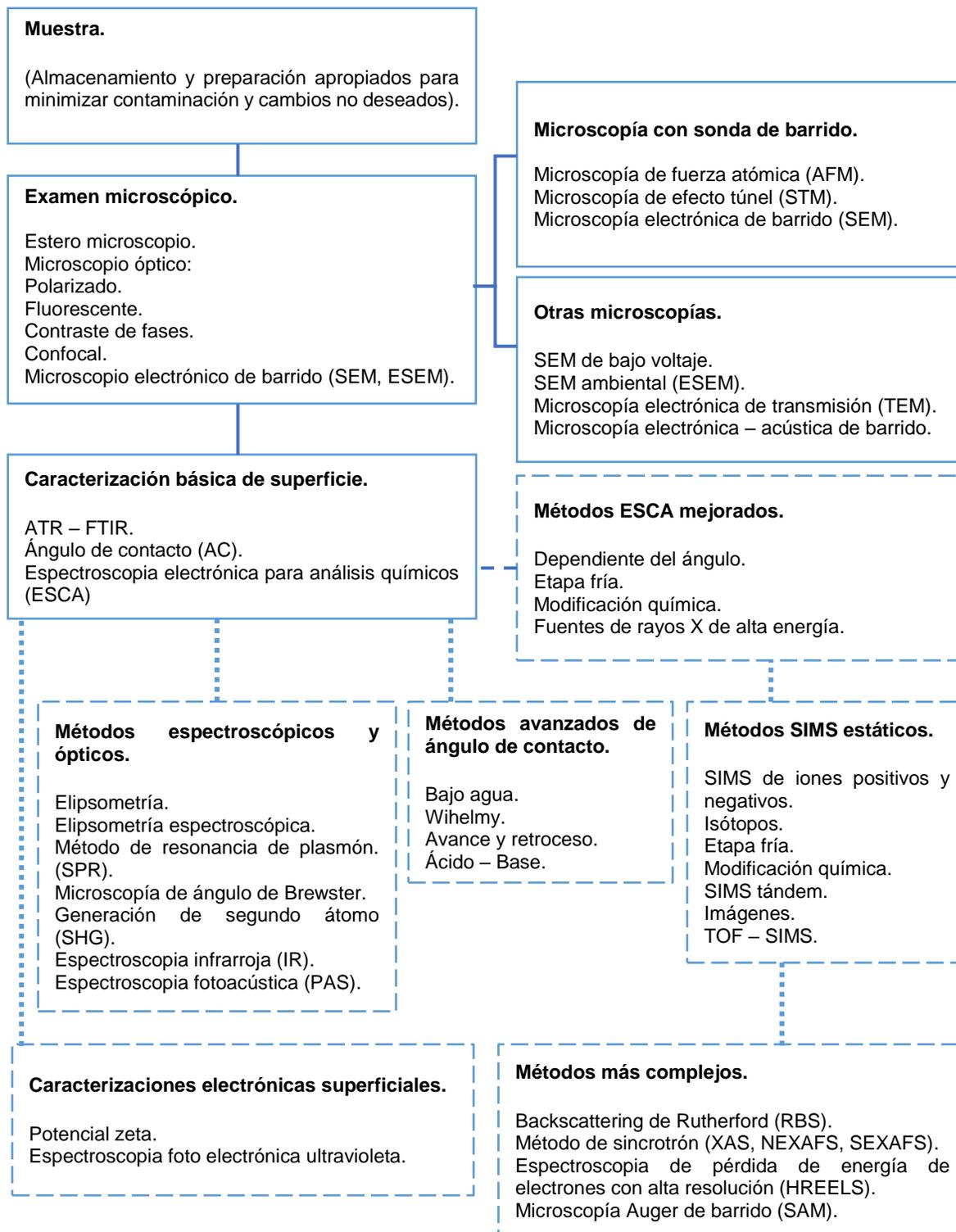
La caracterización de biomateriales puede realizarse mediante distintas metodologías para establecer su comportamiento fisicoquímico, para ello, las pruebas superficiales y de mecánica de fluidos o pruebas de flujo, especialmente aquellas relacionadas con sistemas complejos, son de gran interés en distintos ámbitos tanto científico como industrial. A continuación, se describe parte de dichas metodologías.

### **2.4.1. Pruebas superficiales en biomateriales.**

Los biomateriales interactúan con el organismo mediante su superficie y, en consecuencia, las propiedades de las capas exteriores de un biomaterial son de importancia crítica ante la respuesta biológica al implante como la del biomaterial al medio fisiológico. Uno de los objetivos en el desarrollo de biomateriales, es el diseño de superficies interfaciales específicas con la finalidad de modificar y controlar las respuestas biológicas tales como adhesión, migración, supervivencia y progresión del ciclo celular, expresión y fenotipos diferenciales; integración biológica del biomaterial luego de un determinado periodo de contacto (14, 18).

Con la finalidad de caracterizar la superficie de los biomateriales, se han desarrollado diversos métodos analíticos (Figura 6.), desafortunadamente una sola técnica no es capaz de proporcionar toda la información requerida, por lo que la caracterización total de la superficie requiere de múltiples técnicas analíticas que permitan construir una imagen completa de la superficie y extraer conclusiones definitivas acerca de la naturaleza de ésta de una forma complementaria y coherente entre las técnicas (Apéndice A.1.) (14, 15, 18).

**Fig. 6. Métodos utilizados para la caracterización superficial de biomateriales (Tomado de (18)).**



## 2.4.2. Reología.

La reología (del griego *reos* = fluir y *logos* = estudio) es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales sometidos a fuerzas externas, es decir, analiza la relación existente entre las variables esfuerzo ( $\sigma$ ), deformación ( $\gamma$ ), velocidad de deformación ( $\dot{\gamma} = d\gamma/dt$ ) y tiempo ( $t$ ) de los materiales que son capaces de fluir. Mediante ella se pueden estudiar las propiedades mecánicas del estado sólido, líquido y gaseoso, así como sus mezclas. Para ello, en la reología de fluidos se describen características del sistema de acuerdo a su comportamiento viscosidad y elasticidad; entendiendo por viscosidad la resistencia que ofrece un fluido a la deformación y por elasticidad la propiedad mecánica para sufrir deformaciones bajo la acción de fuerzas externas con la capacidad de recuperar la forma original si dichas fuerzas se eliminan (31-33).

**Tabla 5. Tipo de reológico de interés científico e industrial.**

Cizallamiento	Parámetro	Característica
<b>Simple</b>	Viscosidad aparente.	Determina la relación entre esfuerzo cortante y velocidad de corte.
<b>Oscilatoria</b>	Viscosidad compleja Modulo viscoso. Modulo elástico.	Determina la respuesta ante esfuerzos de corte oscilatorio.

### 2.4.2.1. Pruebas de fluidos bajo cizalla simple.

La deformación de un fluido en un punto dado puede describirse mediante un tensor de deformación (Ec. 1.), que representa los cambios relativos de un elemento cúbico pequeño al ser deformado respecto a dicha posición (34).

$$\gamma_{ij} = \begin{bmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{12} & \gamma_{13} \\ \gamma_{21} & \gamma_{22} & \gamma_{23} \\ \gamma_{31} & \gamma_{32} & \gamma_{33} \end{bmatrix} \dots\dots\dots \text{Ec.1.}$$

Con ello se define la velocidad de deformación, como la variación de la deformación respecto al tiempo (Ec. 2.):

$$\dot{\gamma}_{xy} = \frac{d\gamma_{xy}}{dt} \dots\dots\dots \text{Ec. 2.}$$

Del mismo modo, el esfuerzo aplicado sobre un cuerpo puede especificarse mediante un tensor de esfuerzo (Ec.3.), que representa las componentes de la fuerza que actúa sobre el cubo, respecto a la unidad de área sobre la que se aplica dicha fuerza.

$$\sigma_{xy} = \begin{bmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{bmatrix} \dots\dots\dots \text{Ec. 3.}$$

Si la deformación es uniforme, los tensores de esfuerzo y de deformación no varían con la posición. Éste es el caso de la cizalla simple, que consiste en desplazar dos caras paralelas deslizando una con respecto a la otra, de acuerdo con la Fig. 7.

De esta forma, la cizalla simple permite definir de manera sencilla los tensores esfuerzo de cortante, de deformación y de gradiente de velocidad; este último, describe la variación de la velocidad de deformación respecto a la posición en la dirección perpendicular a las dos caras que se deslizan.

Otro factor de consideración es la viscosidad ( $\eta$ ), la cual representa una medida de la resistencia del material a fluir. En condiciones de flujo estacionario el material puede ser descrito mediante la ley de Newton (Ec. 4.), según la cual, la viscosidad es una constante de proporcionalidad entre el esfuerzo y el gradiente, por lo que a este tipo de fluidos se les denomina fluidos newtonianos.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \dots\dots\dots \text{Ec. 4.}$$

La desviación más simple posible del comportamiento de un fluido newtoniano se produce cuando los datos de cizallamiento simple  $\sigma - \dot{\gamma}$  no pasan a través del origen y / o no resulta en una relación lineal entre  $\sigma$  y  $\dot{\gamma}$ . Por el contrario, la viscosidad aparente, definida como  $\sigma / \dot{\gamma}$ , no es constante y es una función de  $\sigma$  o  $\dot{\gamma}$ . De hecho, bajo las circunstancias apropiadas, la viscosidad aparente de ciertos materiales no es sólo una función de las condiciones de flujo (geometría, velocidad de cizallamiento, etc.). De esta forma, es conveniente agrupar dichos materiales en las siguientes tres categorías (Tabla 6) (35).



Fig. 7. Parámetros determinados mediante ensayos por cizalla simple.

Aquellos fluidos no newtonianos que presentan un comportamiento con independencia al tiempo se caracterizan por una viscosidad aparente que sufre un decaimiento gradual cuando incrementa  $\dot{\gamma}$ . En sistemas poliméricos (soluciones o fundentes), a bajas velocidades de corte, la viscosidad aparente se aproxima a una meseta newtoniana, donde la viscosidad es independiente a la velocidad de cizallamiento (viscosidad de cizallamiento cero,  $\eta_0$ ) (Ec. 5.) (34)

$$\lim_{\dot{\gamma}_{xy} \rightarrow 0} \frac{\sigma_{xy}}{\dot{\gamma}_{xy}} = \eta_0 \dots\dots Ec. 5.$$

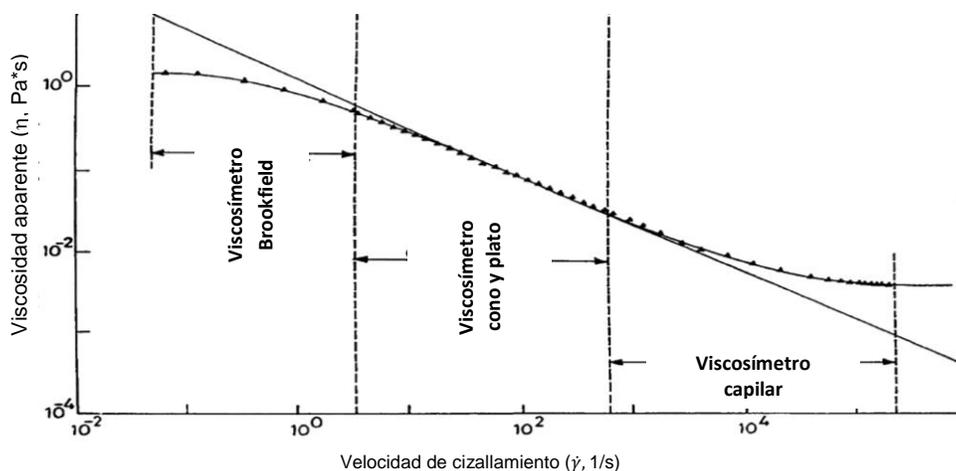
En el caso de soluciones de poliméricas, estas exhiben también una meseta a muy altas velocidades de cizallamiento (viscosidad de cizallamiento infinita,  $\eta_\infty$ ) (Ec. 6.)

$$\lim_{\dot{\gamma}_{xy} \rightarrow \infty} \frac{\sigma_{xy}}{\dot{\gamma}_{xy}} = \eta_\infty \dots\dots Ec. 6.$$

En la mayoría de los casos, el valor de  $\eta_{\infty}$  es sólo ligeramente mayor que la viscosidad  $\eta_s$  solvente. La Fig. 8 muestra este comportamiento en una solución polimérica que abarca toda la gama de valores que van de  $\eta_0$  a  $\eta_{\infty}$ . En raras ocasiones, el límite infinito de cizallamiento logra ser visto para polímeros fundidos y mezclas, espumas y emulsiones, o suspensiones.

**Tabla 6. Clasificación general de fluidos no newtonianos.**

Categoría	Descripción
I	Sistemas para los que el valor de $\dot{\gamma}$ en un punto dentro del fluido se determina sólo por el valor actual de $\sigma$ en ese momento, o viceversa, estas sustancias son conocidos como puramente viscoso, inelástica, independiente del tiempo o fluidos newtonianos generalizadas (GNF).
II	Sistemas para el que la relación entre $\sigma$ y $\dot{\gamma}$ muestra además la dependencia de la duración de cizallamiento y la historia cinemática; estos son llamados fluidos dependientes del tiempo, y finalmente.
III	Sistemas que presentan una mezcla de comportamiento fluido viscoso y de sólidos elásticos. Esta clase de materiales muestran recuperación parcial elástica, retroceso, fluencia, etc. Por consiguiente, éstos se materiales se llaman viscoelástico o fluidos elástico-viscoso.



**Fig. 8. Comportamiento de la viscosidad de una solución polimérica bajo cizallamiento simple**  
Tomado de (34).

### 2.4.2.2. Modelos matemáticos para fluidos bajo cizalla simple.

Un modelado matemático proporciona una manera conveniente y concisa de descripción de los datos, permitiendo estimar la magnitud de parámetros tales como temperatura, efecto de la estructura / composición (por ejemplo, concentración de sólidos), etc. Los modelos reológicos pueden agruparse en tres categorías: **(1) Empíricos**, se deduce a partir de la exploración de los datos experimentales; **(2) Teóricos**, se deriva de los conceptos fundamentales y proporcionan directrices en la comprensión del papel de la estructura indica los factores que influyen en un parámetro reológico y **(3) Estructurados**, considera la estructura y a menudo los cambios cinética en ella, puede utilizarse, junto con los datos experimentales, para estimar los valores de parámetros que ayudan a caracterizar el comportamiento reológico de la muestra. Numerosos modelos se pueden encontrar en la literatura reología en la Tabla 7 se enumeran aquellos que han encontrado un amplio uso en el análisis del comportamiento de fluidos independientes del tiempo (34).

**Tabla 7. Modelos matemáticos de aplicación reológica**  
Tomado de (34).

Modelo	Característica.
$\sigma = \eta \dot{\gamma}$	Modelo Newtoniano.
$\sigma = [\eta_{\infty} \dot{\gamma} + K_s \dot{\gamma}^{\eta_s}]$	Modelo de Sisko para datos a altas velocidades de cizallamiento que presentan $\eta_{\infty}$ .
$\eta_a = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\lambda \dot{\gamma})^m}$	Modelo de Cross para una amplia gama de velocidades de cizallamiento.
$\eta_a = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{[1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^2]^N}$	Modelo de Carreau - Yasuda para una amplia gama de velocidades de cizallamiento.
$\sigma = K \dot{\gamma}^b$	Ley de la potencia aplicado en zona lineal con pendiente diferente a cero.

### 2.4.2.3. Pruebas de fluidos bajo cizalla oscilatoria.

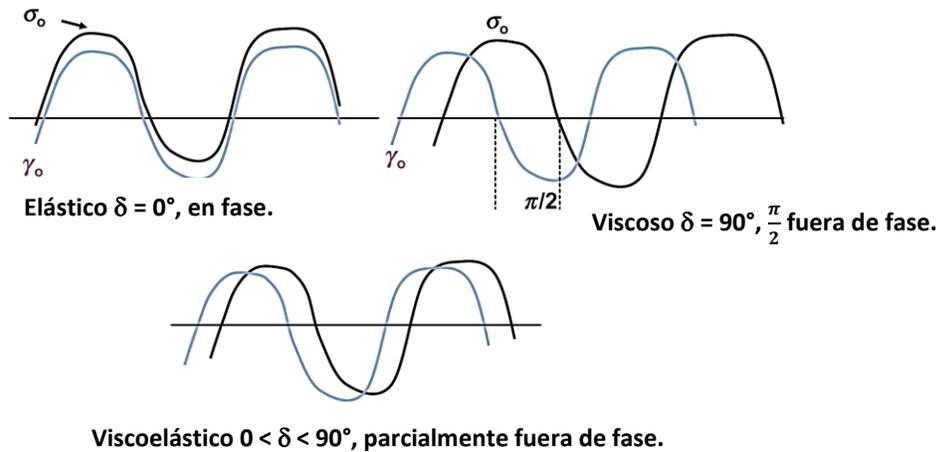
La prueba de cizalla oscilatoria es utilizada ampliamente en la caracterización de materiales viscoelásticos, ya que las contribuciones relativas de la respuesta viscosa y elástica de la muestra pueden determinarse simultáneamente. Este método, consiste en someter una muestra a un esfuerzo o a una cizalla bajo una frecuencia sinusoidal ( $\omega = 2\nu\pi$ , donde  $\nu$  se expresa en ciclos por  $s^{-1}$  o Hz y  $\omega$  en radianes por  $s^{-1}$ ); una vez aplicada  $\omega$  se obtiene una respuesta que puede ser de tres tipos (Tabla 8), una representación esquemática puede observarse en la Fig. 9 (36, 37).

**Tabla 8. Respuesta de una muestra en cizalla oscilatoria  
Tomado de (36).**

Respuesta	Descripción
<b>Elástica:</b>	Se produce cuando el máximo de la amplitud de esfuerzo está en la misma posición que el máximo de la amplitud de la deformación (sin disipación de energía). En este caso, no hay desplazamiento de tiempo entre el esfuerzo y la deformación ondas sinusoidales.
<b>Viscosa:</b>	Ocurre cuando el máximo de esfuerzo está en el punto de máxima velocidad de cizallamiento (el punto de inflexión), es decir, donde hay máxima disipación de energía. En este caso, las ondas sinusoidales de deformación y esfuerzo se desplazan en $\omega t = \pi/2$ , esto se conoce como ángulo de fase o desplazamiento $\delta$ , en este caso, corresponde a $90^\circ$ .
<b>Viscoelástica:</b>	En este caso, el ángulo de fase $\delta$ es mayor que $0^\circ$ pero menor de $90^\circ$ .

Para el caso de un sistema viscoelástico, las ondas sinusoidales de cizalla ( $\gamma$ ) y esfuerzo ( $\sigma$ ) pueden representarse como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \text{ y } \sigma = \sigma_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \dots \dots \text{Ec. 7 y 8.}$$



**Fig. 9. Representación esquemática de respuesta a un esfuerzo y cizalla oscilatorio en sistemas elásticos, viscosos, y viscoelásticos Tomado de (37).**

En donde, al descomponer el esfuerzo (Ec. 8) en dos ondas a la misma frecuencia una en fase con la cizalla y otra a  $90^\circ$  de la fase con lo cual se obtiene la Ec. 9.

$$\sigma = \sigma'_0 * \cos(\delta) * \text{sen}(\omega t) + \sigma''_0 * \text{sen}(\delta) * \cos(\omega t) \dots \dots \text{Ec. 9.}$$

Esta descomposición sugiere la presencia de dos módulos dinámicos, uno establecido por similitud a la Ley de Hook para un sólido ideal ( $G'$ ) y el otro de acuerdo con la Ley de Newton para un líquido viscoso ideal ( $G''$ ), de tal forma que,

$$G' = G * \gamma_0 * \cos(\delta) ; \text{módulo en fase, de almacenamiento o elástico.}$$

$$G'' = \eta * \gamma_0 * \omega * \text{sen}(\delta) ; \text{módulo fuera de fase, de pérdida o viscoso.}$$

de esta manera, la Ec. 9 toma la forma de (38):

$$\sigma = G' * \text{sen}(\omega t) + G'' * \cos(\omega t) \dots \dots \text{Ec. 10.1.}$$

$$G^* = G' + i G'' \dots \dots \text{Ec. 10.2.}$$

Donde  $G^*$  corresponde al módulo complejo  $\left(\frac{\sigma}{\gamma_0}\right)$  e  $i = \sqrt{-1}$ , (32, 38)

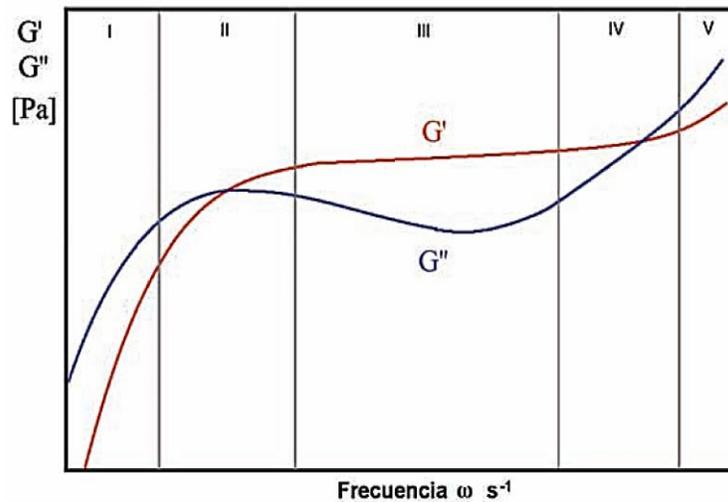


Fig. 10. Respuesta de un fluido real sometido a cizalla oscilatoria.

En la Fig. 10 es posible observar el comportamiento de un fluido real sometido a cizallamiento oscilatorio, en este caso, pueden apreciarse las cinco zonas que se generan dependiendo del dominio de  $G'$  o  $G''$  dada una frecuencia (32).

- Zona I o de flujo** donde  $G''$  predomina, lo que indica un comportamiento viscoso, es decir, el fluido o material fluye. Todos los materiales, incluso los sólidos, exhiben esta zona, pero en algunos casos la frecuencia necesaria para ponerla de manifiesto es tan pequeña que la mayoría de los instrumentos de medida no pueden determinarla. En esta zona  $G''$  aumenta linealmente con la frecuencia mientras que  $G'$  lo hace al cuadrado de la frecuencia.
- Zona II o de transición al flujo**, recibe este nombre ya que, a partir de frecuencias elevadas, cuando aún  $G' > G''$ , se encuentra un punto de intersección entre los módulos que marca el comienzo del comportamiento viscoso, lo cual representa un primer tiempo característico del material
- Zona III o gomosa**, indica la “meseta” presentada por  $G'$ , que puede considerarse esencialmente constante en ese rango de frecuencia. El

comportamiento elástico predomina y el material se comporta como un sólido (solid - like). En algunos casos cuando la pendiente según la cual disminuye  $G''$  es suficientemente pequeña, es posible considerar que esta zona se aproxima a un comportamiento viscoelástico lineal.

- d) **Zona IV o de transición vítrea**,  $G''$  aumentar rápidamente y se produce otro corte entre los módulos, lo cual representa un segundo tiempo característico del material.
- e) **Zona V o vítrea** corresponde a la región cristalina donde  $G''$  predomina.

Este tipo de pruebas se han utilizado para la caracterización de diversas sustancias tales como pinturas, productos de cuidado personal y algunos biomateriales de uso farmacológico como por ejemplo en SYNVISC® (HYLAN G – F 20) (Fig. 11), entre otros.



#### DESCRIPCIÓN

El hilano G-F 20 se encuentra disponible en dos presentaciones:

- Synvisc® (presentación de 2 ml).
- Synvisc-One® (presentación de 6 ml).

El hilano G-F 20 es un fluido elastoviscoso, estéril y apirógeno, que contiene hilanos. Los hilanos son productos derivados del hialuronato (sal sódica de ácido hialurónico), constituidos por disacáridos repetidos de N-acetilglucosamina y glucuronato sódico. El hilano A tiene un peso molecular medio de aproximadamente 6.000.000 y el hilano B es un gel hidratado. El hilano G-F 20 contiene hilano A e hilano B (8,0 mg  $\pm$  2,0 mg por ml) en solución fisiológica tamponada de cloruro sódico (pH 7,2  $\pm$  0,3).

#### CARACTERÍSTICAS

El hilano G-F 20 es biológicamente similar al hialuronato. El hialuronato es un componente del líquido sinovial responsable de su elastoviscosidad. Sin embargo, las propiedades mecánicas (elastoviscosas) del hilano G-F 20 son superiores a las del líquido sinovial y de las soluciones de hialuronato de concentración comparable. El hilano G-F 20 tiene una elasticidad (módulo de almacenamiento  $G'$ ) a 2,5 Hz de  $111 \pm 13$  Pascales (Pa) y una viscosidad (módulo de pérdida  $G''$ ) de  $25 \pm 2$  Pa. Elasticidad y viscosidad del fluido sinovial de la rodilla de humanos de 18 a 27 años de edad medidas con un método comparable a 2,5 Hz son  $G' = 117 \pm 13$  Pa y  $G'' = 45 \pm 8$  Pa. La degradación de los hilanos en el organismo sigue la misma vía que el hialuronato y sus productos de degradación carecen de toxicidad.

**Fig. 11. Ficha técnica de solución de hialinos para el tratamiento de desgaste articular.**

([https://www.synvisc.es/wp-content/uploads/2013/04/FICHA\\_TECNICA\\_SYNVISC.pdf](https://www.synvisc.es/wp-content/uploads/2013/04/FICHA_TECNICA_SYNVISC.pdf))

## 2.5. Médula espinal.

La médula espinal (ME) se considera el tejido nervioso de mayor extensión en el cuerpo humano, ya que sus axones pueden alcanzar distancias desde 0.1 mm hasta 3 metros de largo. En su desarrollo completo la ME alcanza la longitud de 45 cm en los varones y 43 cm en la mujer dentro del hueso intervertebral llamado conducto raquídeo, que parte desde el agujero magno hasta la primera o segunda vértebra lumbar. Abajo de esta zona, empieza a reducir hasta formar una especie de cordón llamado *filum terminale*, con la característica de ser delgado, fibroso y contiene poca materia nerviosa. Por su constitución, tiene una cierta flexibilidad, permitiéndole estirarse cuando se flexiona la columna vertebral. La ME está compuesta por sustancia gris que se dispone internamente y de sustancia blanca constituida por haces de fibras mielínicas de recorrido fundamentalmente longitudinal (39, 40).

Igual que el encéfalo, la médula está encerrada en una funda triple de membranas denominadas como meninges las cuales son: *duramadre espinal o membrana meníngea espinal (paquimeninge)*, *membrana aracnoides espinal* y *piamadre espinal* (Fig. 12). Estas dos últimas constituyen la leptomeninge (39, 41).

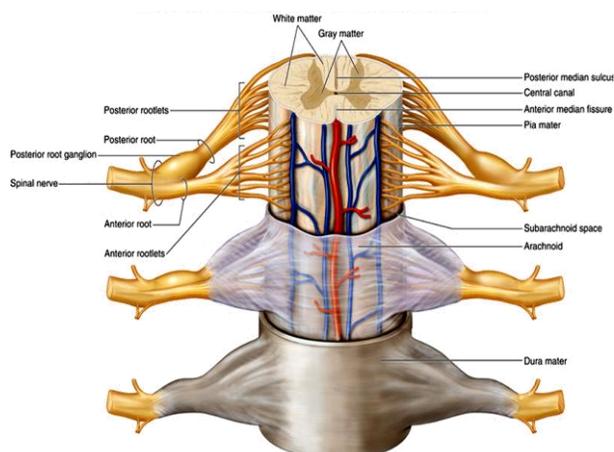


Fig. 12. Esquema anatómico de la médula espinal.

Como parte de sus funciones, la ME transmite información desde los nervios periféricos procedentes de distintas regiones corporales hasta el cerebro, el cual, actúa sobre la médula enviando impulsos hacia el resto del cuerpo, es decir que a través de la ME se transmiten impulsos a los músculos, vasos sanguíneos y glándulas por medio de los nervios que salen de ella; bien en respuesta a un estímulo recibido o en respuesta a señales procedentes de centros superiores del sistema nervioso central. Para ello, de cada lado de la médula surgen 31 pares de nervios espinales, cada uno de los cuales se dividen en: **nervios cervicales** (C1 a C8); **nervios torácicos** (T1 a T12); **nervios lumbares** (L1 a L5); **nervios sacros** (S1 a S5); **nervios coccígeos**, un par (A.2.) (42, 43).

## **2.6. Lesión traumática de la médula espinal (LTME).**

### **2.6.1. LTME como problema Socio - Económico.**

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) constituyen un importante problema de salud que afecta principalmente a la población económicamente activa (25 a 35 años), este tipo de lesión representa un impacto significativo en la calidad de vida a nivel económico, emocional, físico y sexual (44, 45) de aquellos individuos afectados, a tal nivel que en una encuesta realizada a pacientes tetrapléjicos, estos clasificaron como prioridad la recuperación funcional en brazos y manos, mientras que los parapléjicos calificaron la recuperación de la función sexual como la más importante, comparadas con la recuperación de la vejiga o la función intestinal, la erradicación de la disreflexia autonómica, la mejora de los movimientos a pie y la estabilidad del tronco, recuperando sensación normal y eliminación del dolor crónico (46).

Se estima que al año en los Estados Unidos de Norte América se presentan aproximadamente 12,000 nuevos casos de LTME, de los cuales: 40.4 % son accidentes vehiculares, el 27.9 % caídas, 15.0 % por ataques violentos, 8.5 % otras fuentes de lesión y el 8.0 % son lesiones deportivas. De la misma forma, se debe considerar que anualmente se agregan costos directos por LTME de 43.5 billones de pesos por accidentes de vehículo, 22.6 billones de

pesos por violencia, 16.0 billones de pesos por caídas, 8,675 millones de pesos por deportes y 5,900 millones de pesos por otras causas, únicamente en los Estados Unidos de Norte América. (44, 47). En México no existen informes precisos de la prevalencia en el número de LTME dentro de la población, sin embargo, se estima que al año existe una incidencia de 18 casos de LTME por cada millón de habitantes en la Ciudad de México, estos datos son muy similares a los que se presentan en todo el mundo (47, 48).

El desarrollo de tratamientos para las lesiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo LTME, representa un reto debido al complejo entorno en la zona de lesión. Es de considerar que la mayoría de las LTME normalmente se produce por la compresión de la ME debido a fragmentos óseos, material de los discos o desplazamiento de ligamentos, rara vez implica un corte transversal o seccionamiento completo (49, 50). Sin embargo, a pesar de los avances médicos en cuidados y atención especializada, la mortalidad en pacientes con LTME se reporta en un 6 a 17 %, debido principalmente a falla renal, pulmonía, septicemia y suicidio (44).

### **2.6.2. Fisiopatología en LTME.**

En la actualidad no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica normal, debido a que cuando se presenta una LTME, la cual es heterogénea en causa y resultado, ya que puede ser resultante de una contusión, compresión, penetración o maceración de la ME (Fig. 14) (51); en cualquier caso, el daño inicial se ubica en el epicentro de la lesión, lo cual induce un proceso isquémico e inflamación provocando la muerte neuronal primaria (52).

En lesiones que afectan únicamente a la duramadre, la cicatriz formada está compuesta principalmente por astrocitos, pero en lesiones más graves que abren las meninges, la astroglia interacciona con elementos activos como fibroblastos, neutrófilos, microglía, macrófagos y células T. Dicha respuesta de los astrocitos al daño infligido se conoce como gliosis reactiva; la cual, presenta división celular glial limitando la penumbra inmediata que rodea el núcleo de la

lesión, estableciendo un entorno inhibitorio para la regeneración espontánea debido a que se contribuyen a la formación de una barrera mecánica denominada cicatriz glial (53, 54).

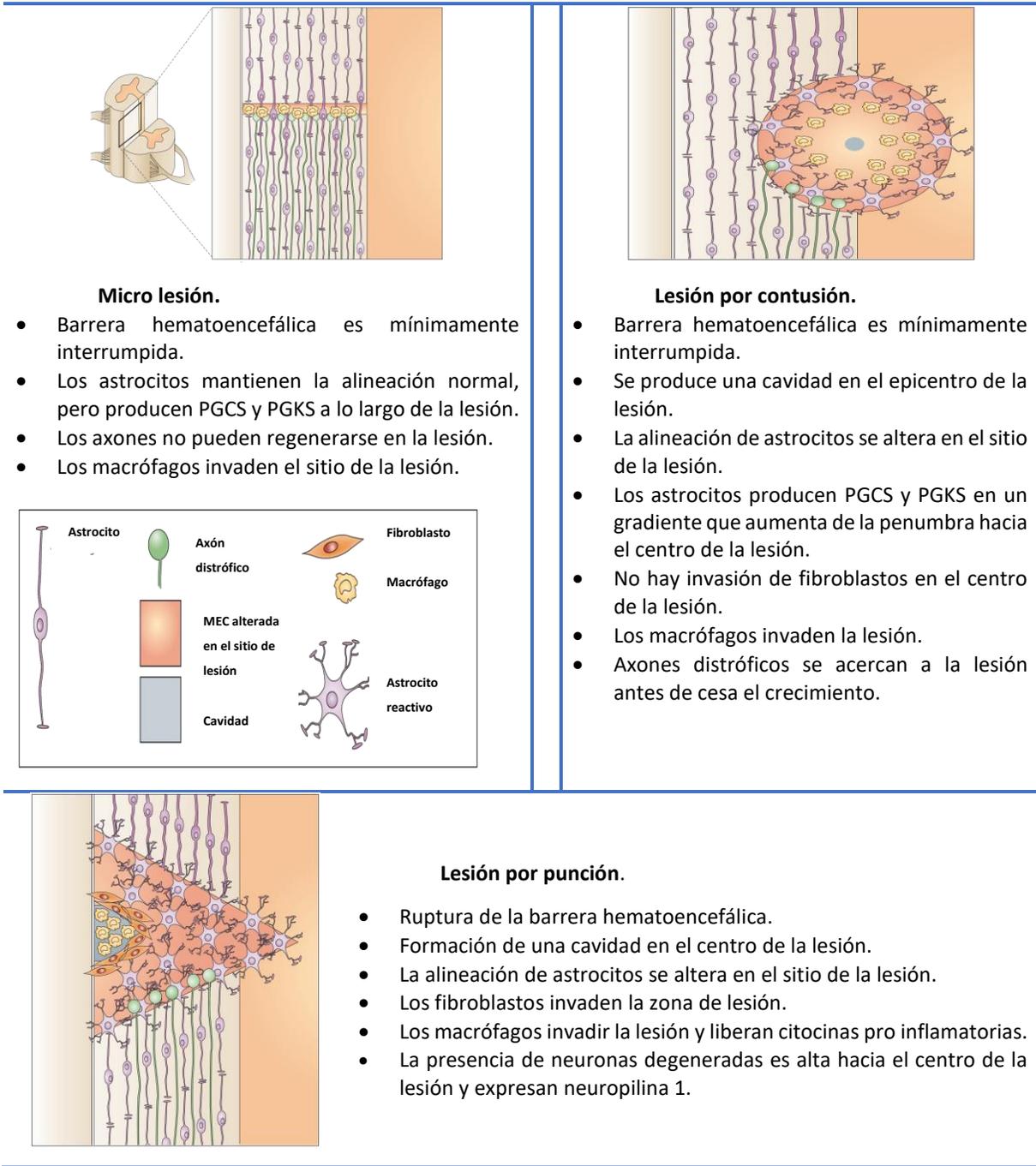
Una vez formada la cicatriz glial, los nervios de la ME son susceptibles a lesiones secundarias, que se producen cuando los nervios y los vasos sanguíneos dañados liberan sustancias bioquímicas que inhiben a las células nerviosas del tejido sano adyacente a la lesión; algunos ejemplo de ellos son: la liberación de aminoácidos excitatorios como glutamato y aspartato que alcanzan niveles citotóxicos después de la lesión; destrucción de las células por la sobre activación de los receptores de glutamato. Otros agentes propuestos en la etapa secundarias incluyen los eicosanoides, especies reactivas de oxígeno (ROS), neuropéptidos, interleucinas, caspasas, monoaminas y el ion  $Ca^{2+}$  (55).

Es por lo que las lesiones de la ME se describen en dos etapas (Fig. 13) conocidas como lesión primaria y lesión secundaria; esta última es de mayor significancia debido a que puede continuar por varias horas o meses post lesión primaria. Una vez que el tejido nervioso de la ME degenera, incrementa el grado de parálisis, causando una mayor pérdida del control motor y la percepción sensorial hasta un punto permanente (49, 50, 56, 57).



**Fig. 13. Progresión de LTME de 1 día hasta 14 semanas.**

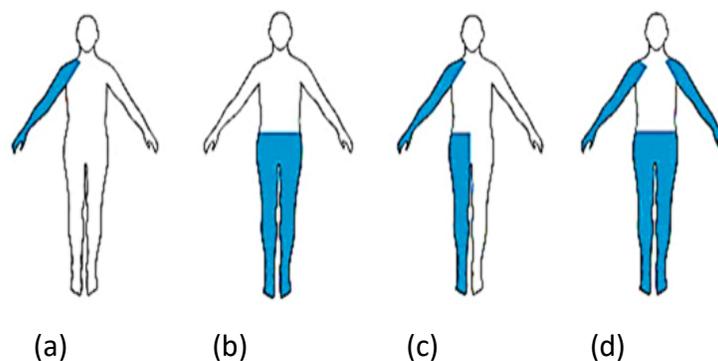
Secciones horizontales a través de la ME de rata a nivel del canal central después de una lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada con un sistema MASICS a 12.5 mm, se presentan una serie de casos que sobreviven a partir de 24 h hasta 14 semanas. En 1 y 3 días, las regiones hemorrágicas son visibles como áreas brillantes debido a la autofluorescencia de las células rojas de la sangre a la luz fluorescente. A los 8 días, la región lesionada contiene gran número de macrófagos y restos celulares. A los 21 días, la cavidad es claramente evidente. A las 14 semanas, la lesión presenta regiones quísticas abiertas y áreas de crecimiento de tejido que contienen astrocitos, fibroblastos y macrófagos. La barra equivale a 1 mm (Tomado de (57)).



**Fig. 14. Representación esquemática de tres lesiones típicas de la médula espinal (Tomado de (54)).**

### 2.6.3. Clasificación de la parálisis debido a LTME.

De acuerdo a la localización y extensión de LTME, se presenta cierto grado de parálisis (Fig. 15), la cual es posible clasificar en cuatro tipos (58):



Tipo		Característica
(a)	Monoplejía	Parálisis de una sola extremidad.
(b)	Diplejía	Parálisis de ambas extremidades superiores o inferiores.
(c)	Hemiplejía	Parálisis de la extremidad superior, tronco y extremidad inferior de un solo lado del cuerpo.
(d)	Cuadriplejía	Parálisis de las dos extremidades superiores e inferiores

**Fig. 15. Representación esquemática de los diversos grados de parálisis**  
(<http://neuropediatra.org/enfermedades/paralisis-cerebral/>).

El efecto de LTME a diferentes niveles vertebrales, está gobernado en gran medida por factores anatómicos como se presenta en la Tabla 9. Aun cuando por regla general, se establece que existirá pérdida de funciones del nivel vertebral lesionado hacia las secciones posteriores o caudales.

**Tabla 9. Consecuencia del nivel en que se realice una lesión de médula espinal**[http://www.msd.es/publicaciones/mmerck\\_hogar/seccion\\_06/seccion\\_06\\_069.html](http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_06/seccion_06_069.html).

Zona de lesión	Nivel de la lesión	Efecto
Cervical	C1 a C5	Parálisis de los músculos requeridos en la respiración, de los músculos de los brazos y piernas; habitualmente es mortal.
	C5 a C6	Piernas paralizadas, capacidad disminuida para flexionar los brazos.
	C6 a C7	Parálisis de las piernas y parte de la muñeca y mano; los movimientos del hombro y de flexión de codo están relativamente preservados.
	C8 a T1	Parálisis de las piernas y del tronco; párpados caídos, pérdida de sudoración en la frente (Síndrome de Horner), brazos relativamente normales y manos paralizadas.
Torácica	T2 a T4	Parálisis de piernas y tronco; pérdida de sensibilidad por debajo de los pezones.
	T5 a T8	Parálisis de piernas y tronco; pérdida de sensibilidad por debajo de la caja torácica.
	T9 a T11	Piernas paralizadas; pérdida de sensibilidad por debajo del ombligo.
	T12 a L1	Parálisis y pérdida de sensibilidad por debajo de la ingle.
Lumbar	L2 a L5	Diferentes patrones de debilidad y entumecimiento de las piernas.
Sacro	S1 a S2	Diferentes patrones de debilidad y entumecimiento de piernas.
	S3 a S5	Pérdida de control del intestino y de la vejiga urinaria, entumecimiento en el perineo.

#### 2.6.4. Estrategias diseñadas para el tratamiento de LTME.

La atención médica en conjunto con investigaciones dirigidas al tratamiento de casos con LTME, han implementado diversas estrategias en pro de una recuperación clínica del paciente afectado, en este sentido cabe mencionar que para el año 2002 más de 70 ensayos clínicos estaban en curso alrededor de todo el mundo; en la Tabla 10 se en listan algunas de estas estrategias (50, 56).

**Tabla 10. Estrategias diseñadas para el tratamiento de LTME.**

<ul style="list-style-type: none"><li>• Reducción del edema y la producción de radicales libres.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Rescate de tejido neural en riesgo de morir en los procesos secundarios.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Control de la inflamación.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Rescate de la población neuronal y de la glía en riesgo continuo de apoptosis.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Reparación de la desmielinización y el déficit de la conducción nerviosa.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Propiciar el crecimiento neurítico a través de mejorar el medio ambiente extracelular.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Terapias de remplazo celular.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Implantar sistemas que limiten disminuyan la separación del tejido en el sitio de lesión.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Esfuerzos de rehabilitación motora.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Restauración de la función perdida por estimulación eléctrica.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Alivio del síndrome de dolor crónico.</li></ul>

Las estrategias enfocadas en implantes de sistemas capaces de retrasar o frenar la progresión de los procesos secundarios en LTME mediante la aplicación de agentes neuroprotectores y neuroregeneradores en combinación, tales como proteínas y biomateriales poliméricos presentan actualmente un gran interés en diversos grupos de investigación.

## 2.7. Albúmina de suero.

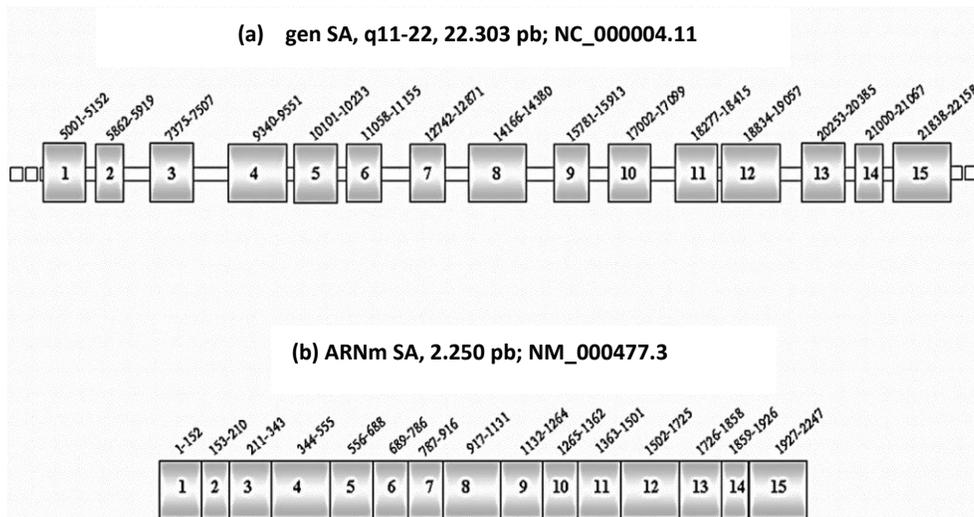
La albúmina de suero (SA), es la proteína de mayor abundancia en el plasma, ésta es una macromolécula monomérica multidominio, que presenta diversas funciones importantes en el cuerpo, incluyendo el mantenimiento de la presión oncótica, contribuye como reserva de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas, funge como amortiguador de pH, previene la formación patológica de trombos, ayuda a mantener la permeabilidad microvascular normal, presenta capacidad de unión a una gran variedad de moléculas (Tabla. 11); es la principal acarreadora de ácidos grasos, afecta la farmacocinética de algunos medicamentos, disminuye algunos efectos tóxicos al organismo, presenta características pseudo enzimáticas, constituye la mayor parte de la capacidad antioxidante que ofrece el plasma; en la última década, se ha explorado su aplicación en el área biotecnológica al incluirla en el implante de biomateriales, adhesivos y selladores quirúrgicos, entre otras (7, 59-61).

**Tabla 11. Sustancias endógenas y exógenas acarreadas por la albúmina**  
Adaptado de (60, 61).

Origen	Sustancia	
<b>Endógenos.</b>	Bilirrubina, Calcio, Cobre, Cisteína, Vitaminas liposolubles, Ácidos grasos, Radicales libres, Glucocorticoides Tiroxina (T4), Triptófano.	
<b>Exógenos.</b>	Antiinflamatorios.	Fenilbutazona, Ácido salicílico, Ibuprofeno.
	Antimicrobianos.	Cefalosporinas, Penicilinas, Sulfonamidas, Tetraciclinas.
	Cardiovasculares.	Digitoxina, Furosemida, Hidralazina, Propanolol, Quinidina.
	Actividad en SNC.	Amitriptilina, Clorpromazina, Diazepam, Fenobarbital, Tiopental.

### 2.7.1. Estructura de la proteína de albúmina de suero.

La biosíntesis de la SA se lleva a cabo en los hepatocitos, la cual da inicio una vez que el gen SA (Fig. 16a) presente en una sola copia en el brazo largo del cromosoma 4 es procesado a un ARNm SA de 2,250 pb (Fig. 16b), el cual posteriormente dará origen a una preproalbúmina que es modificada en el lumen del retículo endoplasmático para general la pro albúmina. Entonces la furina escinde un oligopéptido de 6 - aminoácidos en el amino terminal (N-terminal) dentro de la red trans Golgi para obtener una proteína plasmática madura, constituida de una sola cadena de 580 a 585 residuos (dependiendo de la especie) con un peso molecular aproximado a 69,000 Daltones (Da) con un tiempo de vida en el organismo de 28 a 36 días (61, 62).



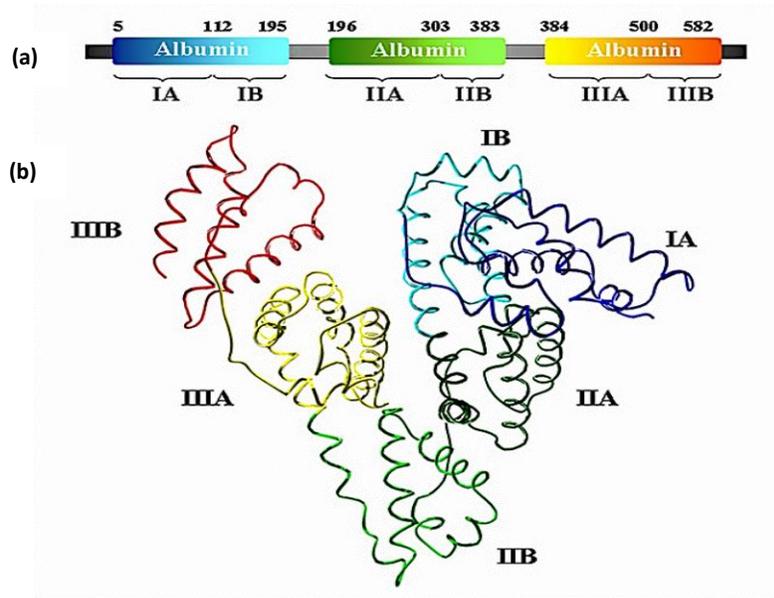
**Fig. 16. Organización del gen y ARNm para SA.**

El gen SA se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4, cerca del centrómero en la posición q11-22, se compone de 22,306 pares de bases (pb) subdividido en 15 exones y 14 intrones. Los exones e intrones están numerados de acuerdo con la secuencia de referencia GenBank NC\_000004.11. La transcripción del gen SA como ARNm SA se compone de 2,250 pb; nuevamente las pb de los exones se presentan numeradas según la secuencia de referencia GenBank NM\_000477.3 (Tomado de (60)).

La estructura primaria de SA (Fig. 17a) presenta un único residuo de triptófano en la posición 214; los residuos de metionina, glicina e isoleucina son bajos, mientras que los de cisteína, leucina, glutamina y lisina, son abundantes. El gran número de residuos ionizables da a SA una alta carga, es decir, 215 iones por moléculas a pH 7.0; lo que facilita su solubilidad. Además, los residuos ácidos de los aminoácidos superan en número a los básicos en la SA, lo que resulta en una carga neta negativa por molécula de aproximadamente  $-15$ , a pH 7.0. También contiene 35 residuos de cisteína que forman 17 puentes bisulfuro, con el único residuo de cisteína libre en la posición 34 (62).

La estructura secundaria de la SA es dominada por plegamientos tipo  $\alpha$  – hélices (68 %), sin ningún elemento tipo  $\beta$  - plegado con un arreglo conformacional globular en forma de corazón que contiene tres dominios homólogos generalmente indicados como I (1 - 195), II (196 - 383) y III (384 - 585) que otorgan a SA unas dimensiones aproximadas de  $8 \times 8 \times 3$  nm. Los tres dominios son comparables en la secuencia de aminoácidos como se presentan en la estructura secundaria (Fig. 17b) (60).

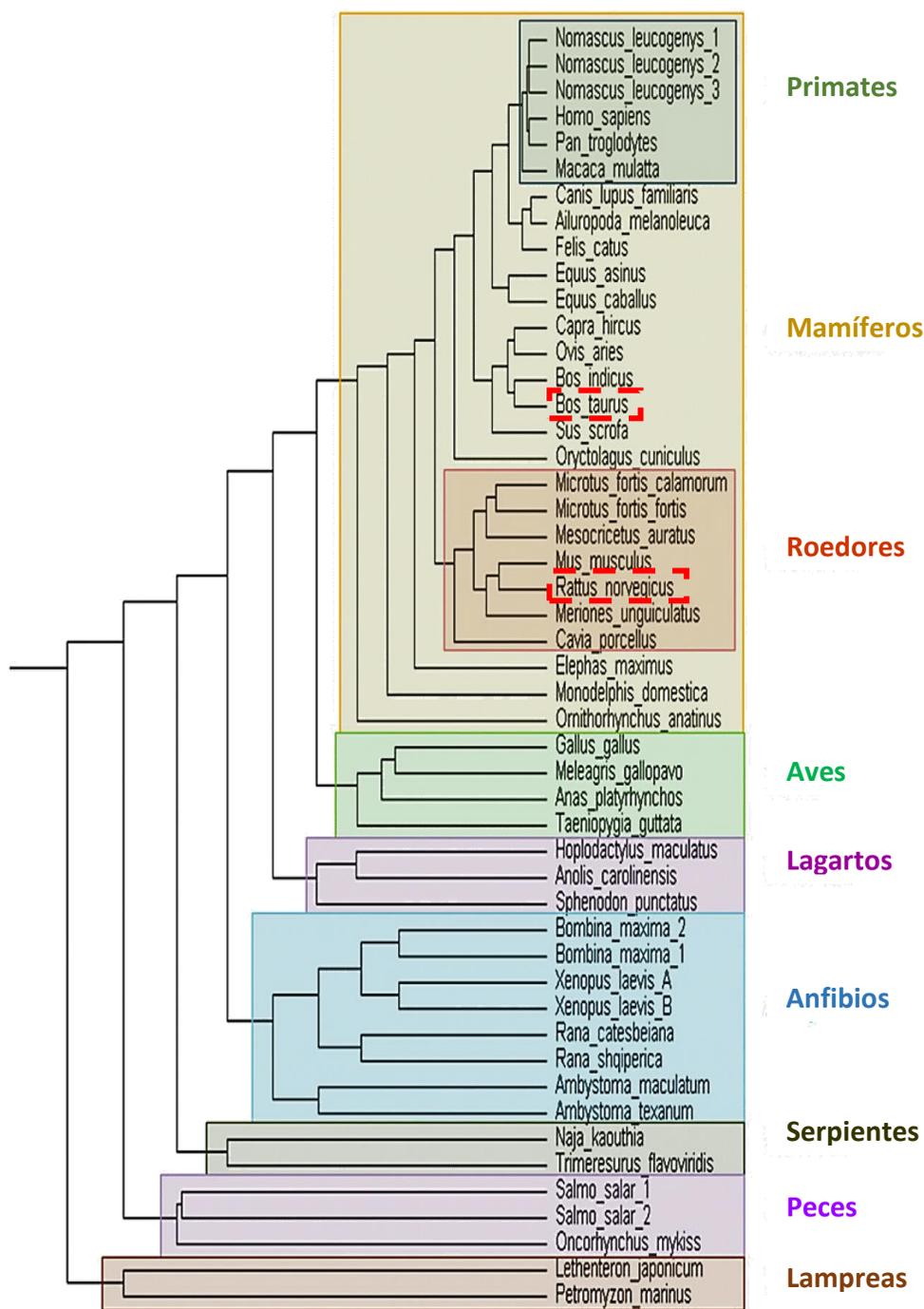
Cada dominio incluye diez hélices que son empaquetadas en dos subdominios llamados A y B, constituidos de seis ( $h_1 - h_6$ ) y cuatro ( $h_7 - h_{10}$ )  $\alpha$  - hélices, respectivamente, conectadas por un amplio bucle. El plegamiento de la cadena polipeptídica y la topología de los enlaces bisulfuro son similares entre los subdominios. El subdominio IIA está conectado a la región de interfaz entre el subdominio IA y IB por interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno. Dicha característica conduce a la forma T de los dominios I y II que son casi perpendiculares entre sí. El dominio III, sobresale del subdominio IIB para formar en conjunto la forma de Y para los dominios II y III, que interactúa con el subdominio IIB. Los dominios II y III se encuentran separados por un gran canal formado por los subdominios IB, IIA y IIIB. La región terminal de la secuencia en los dominios contribuye a la formación de inter - dominios, a su vez 9 largas hélices unen los dominios IB a IIA (173 a 205 residuos) y IIB a IIIA (336 a 398 residuos). A pesar de similitud estructural, cada dominio interactúa con el dominio vecino de diferente manera. Por ello, la orientación de los dominios I y II con respecto a los dominios II y III constituyen un entorno asimétrico en el que se encuentra una variedad de sitios de unión a ligandos (59).



**Fig. 17. Organización modular de los dominios en la albúmina.**

El panel superior muestra la estructura secundaria de la albúmina, con tres dominios repetidos conservados. El panel inferior muestra la estructura tridimensional de la albúmina con sus subdominios presentados en diferente color (Tomado de (59))

En general, la SA ostenta múltiples aplicaciones biológicas, tal como lo refleja su distribución de acuerdo con la clasificación taxonómica de vertebrados. Aunque no es común inferir las relaciones filogenéticas por análisis secuencial de una sola proteína, el árbol cladograma (Fig. 18) muestra la evolución molecular de SA permitiendo agruparla en unidades taxonómicas operacionales en clases y ordenes; con ello se ha podido establecer que el dominio III en la albúmina de suero humana (HSA) preserva un 40 % de identidad con el dominio III de la albúmina de suero de rata (RSA), un 28 % de identidad con el dominio III de la albúmina de suero de salmón (SAS) (62, 63). Otros estudios establecen una homología entre BSA, RSA y albúmina de suero equina (ESA) del 75.6 %, 74.2 % y 76.1 % en relación a HSA (64, 65).



**Fig. 18. Árbol Cladograma de las secuencias de 50 albúmina de sueros.**

Fragmentos de albúmina de suero menores a 200 residuos de longitud fueron eliminadas. En este estudio se utilizaron SA de bovino y rata (en cuadro rojo punteado) (Tomado de (59)).

### **2.7.2. Albúmina de suero como transportador.**

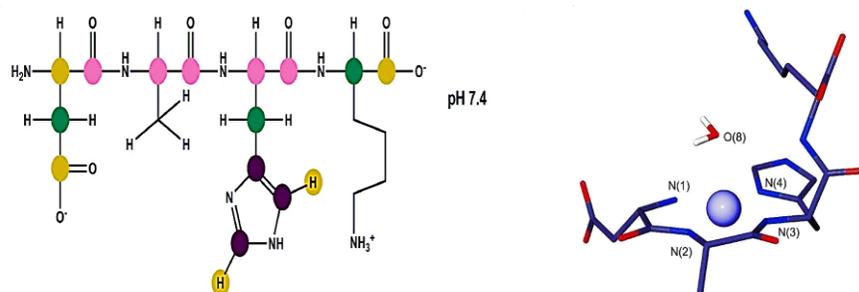
La estructura terciaria de SA le permite unirse y transportar moléculas muy diversas, incluyendo metabolitos como colesterol, ácidos grasos, cationes y aniones, aminoácidos y gases como el óxido nítrico (NO); en este último caso, la SA funciona como un reservorio de corta duración para NO libre, el cual se une al tiol de la cisteína 34 que es liberado tras la exposición a un pH bajo. En caso de hipoxia tisular, SA sufre transiciones estructurales y libera NO, manteniendo así el tono vascular (59, 60).

### **2.7.3. Actividad antioxidante y neuroprotectora de la albúmina de suero.**

La SA naturalmente despliega actividad antioxidante en el plasma, ya que es la principal fuente extracelular de grupos sulfhidrilo reducida, que actúan como eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), también puede limitar la producción de estas especies reactivas por la unión a metales como Mg (II), Al (III), Ca (II), Mn (II), Co (II/III), Ni (II), Cu (I/II), Zn (II), Cd (II), Pt (II), Au (I/II), Hg (II) y Tb (III) que son capaces de acelerar la producción de radicales libres, estructuralmente la Cys34 y la sección amino terminal de SA son de importancia en los procesos de captura de dichos metales. Algunos estudios han documentado que el estado redox de SA cambia potencialmente durante la oxidación de diferentes agentes oxidantes convirtiéndose así en un biomarcador de procesos oxidativos, ya que posteriormente a su oxidación, la SA es más susceptible a la digestión con tripsina y en consecuencia es degradada con mayor rapidez en comparación con la contraparte no oxidada (7, 59, 66).

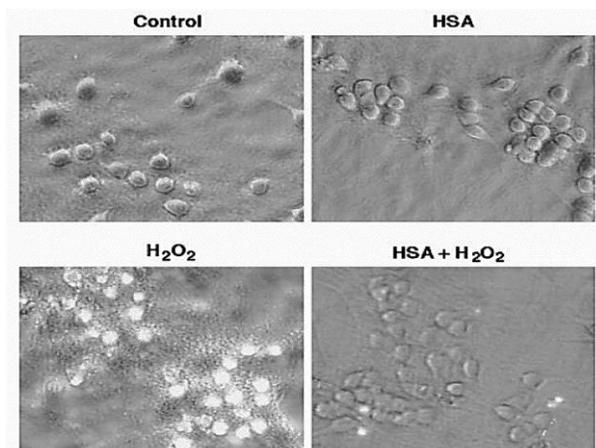
Se ha identificado que el péptido DAHK presente en sitio amino terminal es el responsable del efecto antioxidante de la SA, bajo acción quelante debido a su interacción directa con los metales antes mencionados; ejemplo de ello son los trabajos realizados por Hureau y cols. (66) que mediante estudios de rayos X demostraron las propiedades redox de DAHK (Fig. 19 ); Gum y cols. (10), observaron una menor cantidad de células muertas por efecto de adición de DAHK y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al medio de cultivo de tejido nervioso en comparación con los mismos cultivos

a los que únicamente se añadió  $H_2O_2$ , con ello fue comprobado el efecto antioxidante del mismo péptido ante un agentes oxidantes como el  $H_2O_2$  (Fig. 20).



**Fig. 19. Representación esquemática del péptido DAHK y su sitio de acción quelante.**

Representación esquemática de la señal de RMN los átomos de carbono (C) e hidrógeno (H) por del péptido DAHK a pH 7,4. El código de colores corresponde a: morado = muy alta, verde = alta, amarillo = moderada, rosa = ligeramente. (b) Representación de la estructura del complejo  $[Cu^{II}(DAHK)]$  obtenida mediante estudios de rayos X. El ion cobre se presenta penta-coordinado con los cuatro nitrógenos en posición ecuatorial [N (1) a N (4) con una molécula de agua en posición apical O (8)] (Tomado de (66)).



**Fig. 20. Microfotografía que muestra el efecto antioxidante de HSA ante  $H_2O_2$ .**

Se presenta el cultivo de tejido nervioso con un tratamiento simultáneo con  $100 \mu mol/L$  de  $H_2O_2$  adicionando albúmina humana (HSA) por una hora. Veinte horas posteriores al tratamiento, se tomaron las microfotografías combinando microscopía de contraste y de fluorescencia. Las células nerviosas muertas se identifican por la fluorescencia del yoduro de propidio (Tomado de (10)).

Asimismo, se ha reportado que SA está implicada en muchas enfermedades neurológicas debido a su capacidad para regular las propiedades hemodinámicas de la circulación cerebral y al mismo tiempo, actuar directamente como neuroprotector sobre las células en tejido nervioso. En daño cerebrovascular isquémico experimental, se ha observado que la administración exógena de SA funciona como un neuroprotector a través de la reducción de la inflamación cerebral, la prevención de trombosis post - isquémica, el efecto antioxidante, hemodilución y el aumento de la perfusión del tejido isquémico. Estos efectos neuroprotectores de SA se atribuye en parte a sus propiedades antioxidantes y modulación de la señalización intracelular tanto de las células neuronales como gliales (67). Por su parte Díaz - Ruíz y cols. (11), probaron que el uso de DAHK en procesos isquémicos cerebrales, reduce notablemente el daño por este tipo de lesión en comparación con los grupos control con ello se reafirma que este péptido presente en el amino terminal presenta propiedades neuroprotectoras en tejido del SNC.

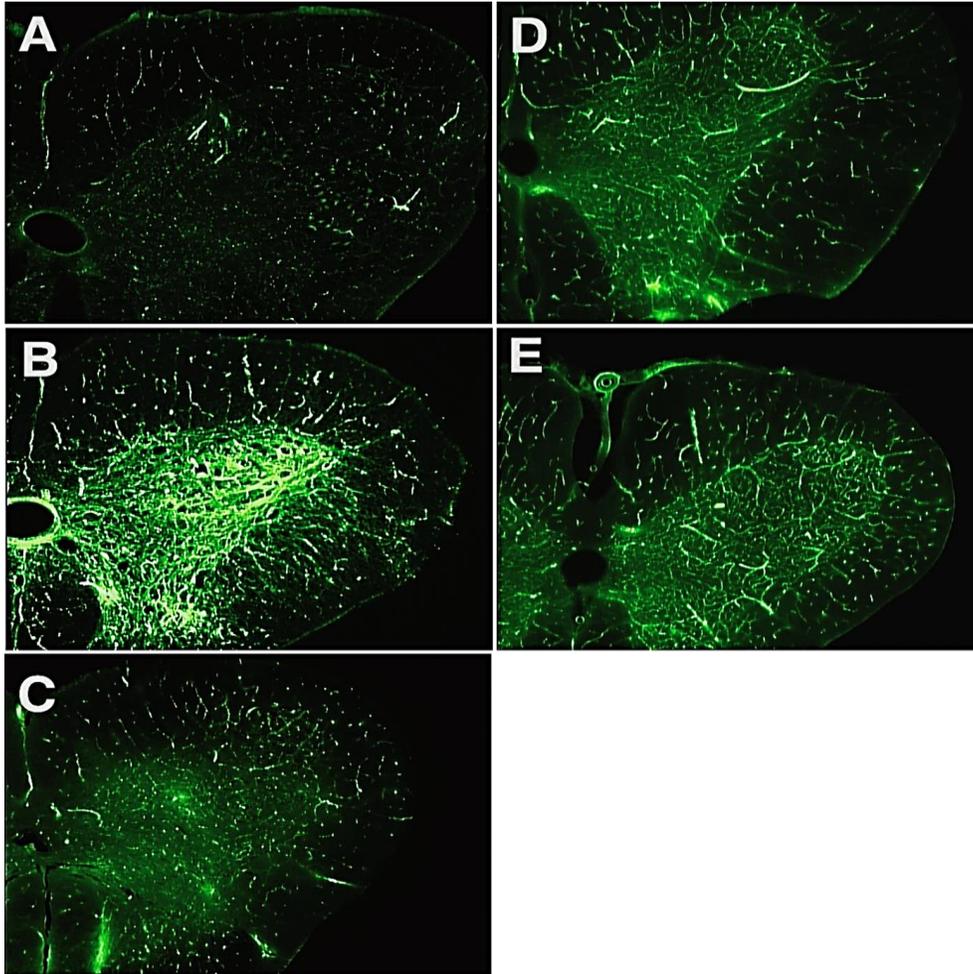
Wang y cols. (68), sugieren que el entorno extracelular del SNC, que consiste en una baja concentración de proteínas en el LCR (Tabla 12) y en los fluidos intersticiales, así como una presión intersticial positivo, puede disminuir la vulnerabilidad del SNC, en particular de la ME, a procesos de isquemia. En dicho estudio, comprobaron que, al disminuir el volumen de LCR intratecal para generar isquemia y al reemplazarlo con LCR combinado con SA a una baja presión intratecal durante el proceso de perfusión de ME a nivel lumbar, se obtuvo un efecto de neuroprotección ante un proceso isquémico en ME (Fig. 21), sugiriendo que bajo dichos tratamientos de LCR + SA se puede mantenerse una microcirculación normal evitando el fenómeno isquémico de “no reflujo”.

Por otro lado, Eady y cols. (69), demostraron el efecto neuroprotector del complejo ácido docosahexanoico – albúmina (DHA – SA) en dosis moderada ante una isquemia cerebral. Es importante destacar que el complejo DHA – SA, ofreció una ventana terapéutica de 5 a 7 horas posteriores al daño cerebrovascular. Este tiempo es clínicamente relevante, ya que es difícil de establecer un tratamiento en pacientes con accidente cerebrovascular agudo en las primeras horas. Este carácter neuroprotector lo atribuyen en una parte a que la SA *per se* ha funcionado como neuroprotector en modelos de isquemia cerebral focalizada, isquemia global, daños

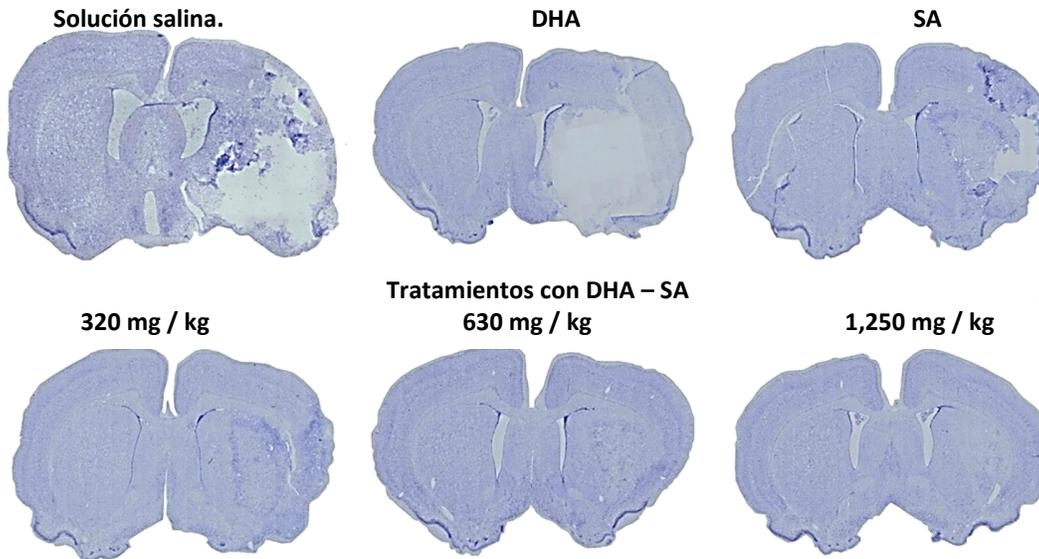
hemorrágicos y traumatismo cerebral; por el otro lado, también se atribuye este efecto a la propiedad de SA como transportador de ácidos grasos libres que pueden ser liberados directamente a las células nerviosas como es el caso del DHA el cual es necesario en el desarrollo y buen funcionamiento del sistema nervioso. En trabajos del mismo grupo se observó que el tratamiento de daño isquémico en ratas con DHA proporcionó la recuperación neuroconductual, así como la disminución del infarto y edema cerebral (Fig. 22).

**Tabla 12. Componentes proteicos en la fracción intratecal del fluido cerebroespinal en condiciones normales (Tomado de (70)).**

Proteína	Peso molecular (kDa)	Concentración en LCR	Relación LCR/suero	Fracción intratecal (%)
<b>β-Proteínas</b>	25	16.6 mg/L	34:1	>99
<b>Cistatina C</b>	13.3	3.1 mg/L	5:1	>99
<b>Proteína Tau</b>	55 – 74	0.20 µg/L	10:1	>99
<b>s - 100β</b>	21	1.5 µg/L	18:1	>99
<b>Transtiretina</b>	55	17 mg/L	1:18	≈ 90
<b>s – ICAM</b>	90	1.5 µg/L	1:190	≈30
<b>Albúmina</b>	<b>67 – 69</b>	<b>245 mg/L</b>	<b>1:205</b>	<b>0</b>
<b>IgG</b>	150	25 mg/L	1:440	0
<b>IgA</b>	170	1.0 mg/L	1:800	0
<b>IgM</b>	900	0.2 mg/L	1:3400	0
<b>ACEM</b>	150	-	1:100	≈65



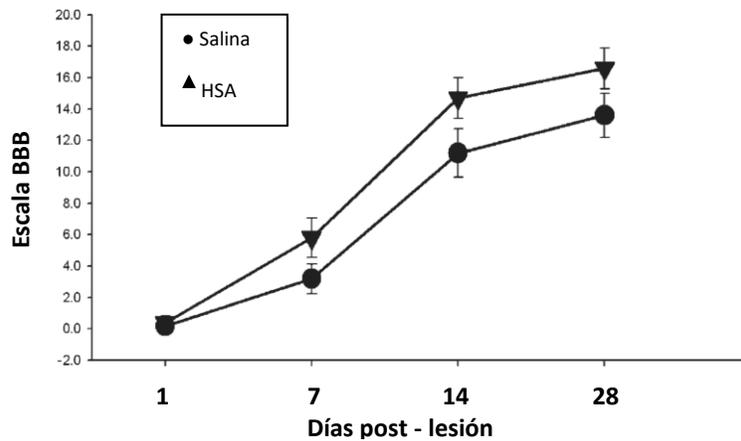
**Fig. 21. Microcirculación después de 1 h de isquemia y reperfusión con FTCl - BSA.**  
 (A). Sección de médula espinal de conejo al que se le removió el LCR manifiesta una débil señal fluorescente, con ausencia de relleno capilar tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, lo que indica un fenómeno de “no reflujo”. (B) Sección de médula espinal con LCR agotado que presenta una intensa señal de fluoresceína, que es mayor en la materia gris y la materia blanca, lo que indica una buena perfusión sanguínea. (C) Sección de médula espinal con reemplazo de LCR en el que la materia gris presenta una débil señal fluorescente similar a la de la materia blanca, lo que indica un marcado déficit en la perfusión arterial; es decir, el fenómeno de “bajo reflujo”. (D) Sección de médula espinal con reemplazo de LCR más albúmina, y (E) Sección de médula espinal con reemplazo de LCR más gelatina; se observa el llenado capilar tanto de la materia gris como en la materia blanca (Tomado de (68)).



**Fig. 22. Histopatología de una lesión isquémica cerebral tratada con DHA - SA.**

Imágenes de cerebro de ratas embebidas en parafina con tinción de Nissl tratadas con solución salina, DHA (5 mg/kg), SA (630 mg/kg) o DHA - SA (5 mg/kg + 320; 630 o 1,250 mg/kg). Las ratas con tratamiento con solución salina o SA mostraron una gran región de infarto cortical y subcortical. Las ratas tratadas con DHA presentaron una menor extensión de daño. Por el contrario, las ratas tratadas con el complejo DHA - SA exhiben un infarto muy pequeño, sobre todo en la zona subcortical (Tomado de (69)).

Adicionalmente, Caín y cols. (55) reportaron el tratamiento de LTME en ratas a las cuales inyectaron vía intravenosa 1g/kg de una solución de HSA al 30%, dando seguimiento a la recuperación motora mediante la escala de Basso - Beattie - Bresnahan (BBB; A.3.); encontrando que las ratas tratadas con HSA presentaron una recuperación motriz de 16 puntos en contraste con el grupo control que obtuvo 13 puntos en la escala BBB (Fig. 23), con lo cual Caín y cols. (55), demostraron que el suministro de HSA vía intra venosa ejerce el mismo efecto neuroprotector en las primeras horas post - LTME.



**Fig. 23. Evaluación de la función motora mediante escala BBB en ratas con LTME.**

Se compara la recuperación motora de ratas control y ratas con inyección intravenosa de una solución al 30 % de 1 g / kg de HSA. El análisis estadístico determinó valores significativos ( $P < 0.05$ ) en el grupo con HSA en los días 7, 14 y 28. Se muestran el media  $\pm$  error estándar (Tomado de (55)).

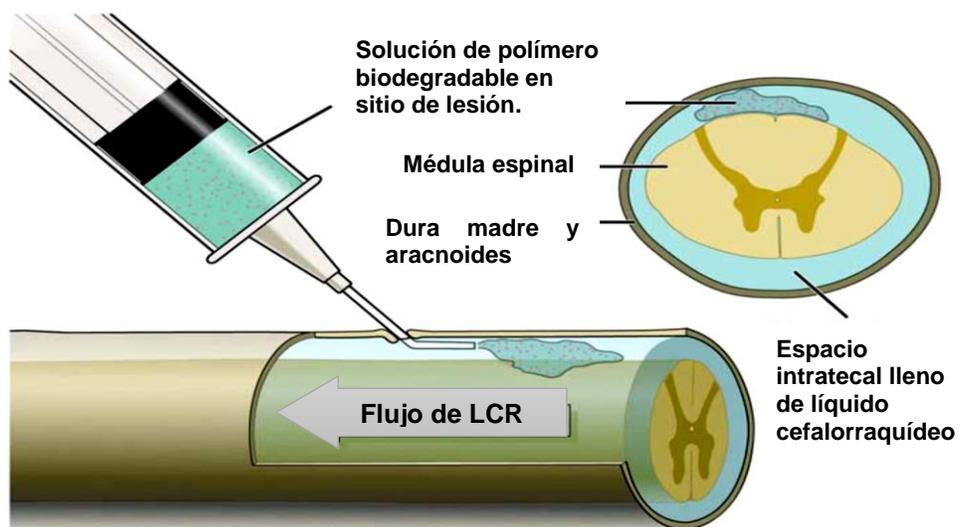
## 2.8. Biomateriales y tratamiento de lesiones en médula espinal.

La incidencia de LTME y procesos degenerativos tanto primarios como secundarios demandan el diseño de terapias que incrementen la supervivencia celular, sobre todo durante los procesos secundarios que pueden variar de horas a días. Una estrategia ante los procesos involucrados es el tratamiento con moléculas o sustancias con características neuroprotectoras y neuroregenerativas en el sitio de lesión; sin embargo, la mayoría de ellas no pueden cruzar la barrera hematoencefálica por lo que el suministro sistémico resulta poco eficiente.

Actualmente, una estrategia de suministro es mediante un bolo vía intratecal que resulta en una rápida eliminación o lavado de ROS y NOS debido al flujo del LCR en el espacio intratecal; por otro lado, el uso de catéter externo se asocia a cicatrices e infecciones, a pesar de ser una forma de entrega continua para el suministro de fármacos por bombeo tales como analgésicos y antiespásticos en dolencias crónicas (50, 71, 72).

En la última década, se han desarrollado formulaciones compuestas de soluciones concentradas de polímeros biodegradables capaces de estructurarse en el sitio de LTME una vez

microinyectados (Fig. 24) y al mismo tiempo capaces de funcionar como un soporte o andamio celular, dichas formulaciones representan una alternativa para resolver los problemas de eliminación o lavado por el flujo del LCR ya que la viscosidad del material inyectado suele ser mayor y por ende, difícil de arrastrar (71-73).



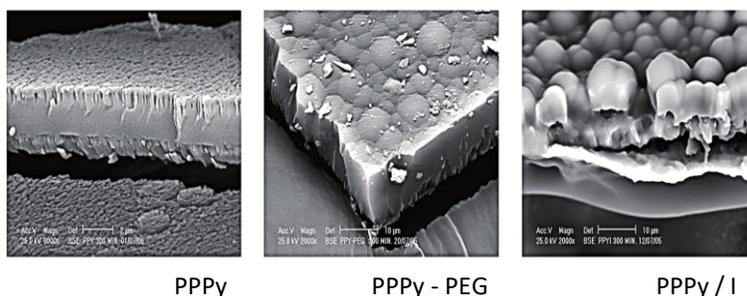
**Fig. 24. Sistema de liberación intratecal de biomoléculas activas.**

La solución de polímero biodegradable es inyectada intratecalmente en el sitio de lesión.  
(Tomado de (50))

Uno de los biomateriales cuyo interés ha crecido es el Polipirrol (PPy), el cual es un polímero que ha sido elegido como un material para la regeneración del tejido nervioso debido a sus inherentes propiedades eléctricas, facilidad de preparación, características superficiales, entre otras propiedades (1).

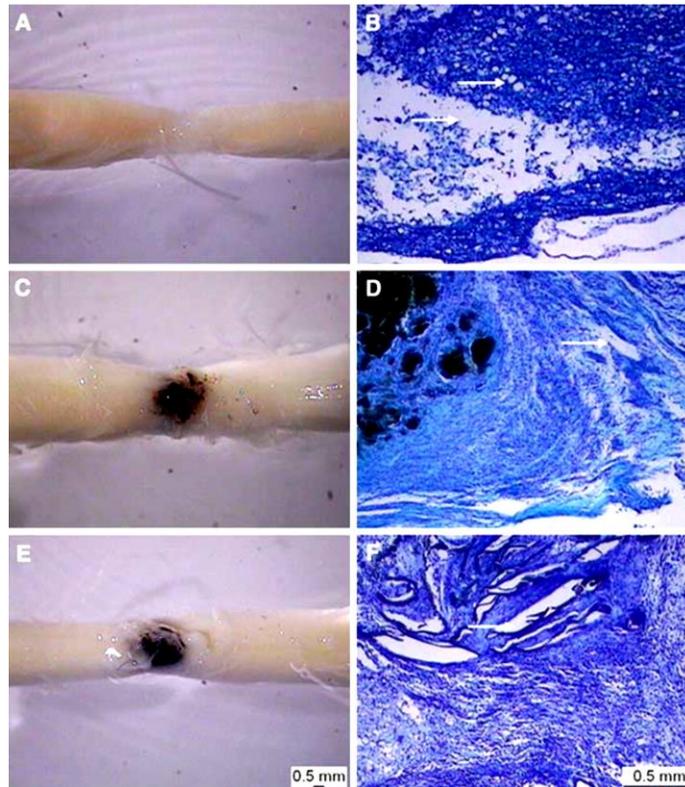
Los biopolímeros de PPy han mostrado ser biocompatibles, por ejemplo en estudios *in vitro* realizado con células endoteliales, osteoblastos, tejido nervioso, líneas celulares PC - 12 y Neuro 2a; mientras que los implantes de PPy en músculo de rata, tejidos hipodérmico y en cerebro de cobaya, representan algunas pruebas *in vivo* por un período de entre 2 a 4 semanas, han mostrado la inocuidad del PPy (74), aunque, su comportamiento *in vivo* no ha sido entendido por completo.

Por su parte, tanto Cruz y cols.(75) como Olayo y cols. (76) realizaron pruebas *in vivo* con biopolímeros de Polipirrol sintetizados por energía de plasma en combinación con Polietilenglicol (PPPy – PEG) o Yodo (PPPy / I) (Fig. 25), en el primer caso, se buscó combinar las aminas con los grupos oxigenados de los glicoles para con ello incrementar la biocompatibilidad de PPPy - PEG. Por otro lado, el dopaje con Yodo al realizar la síntesis mediante energía de plasma se cree que éste debiera encontrarse uniformemente distribuido a lo largo del material en una proporción de un átomo de Yodo por cada siete u ocho anillos de Pirrol, con lo es posible genera un biomaterial, que, al estar en contacto con soluciones ricas en electrolitos, es capaz de incrementar en varios ordenes de magnitud su conductividad eléctrica gracias al dopaje con Yodo. Dichos polímeros fueron probados en animales de laboratorio a los cuales se implantó una pastilla del biomaterial posterior a haberles realizado una lesión por sección completa en la médula espinal (LSCME). En estos estudios, se encontró que el material PPPy *per se* no genera una respuesta inmune en el huésped; al evaluar la recuperación motriz de acuerdo con la escala BBB, los animales con el implante de Polipirrol dopado con Yodo (PPPy/I) mostraron una mejoría considerable de alrededor de 5 puntos BBB, en comparación con los grupos control, que obtuvieron como máximo 3 puntos BBB. En un análisis histológico de implantes de PPPy/I y PPPy – PEG (Fig. 26) en LSCME (76) pudo observarse que, en el grupo control, se generan grandes cavidades (quistes) en el tejido los cuales limitan los procesos de regeneración y reconexión celular en el tejido nervioso, persistiendo así la parálisis. En contraste con el tratamiento PPPy/I y PPPy – PEG se observó una menor zona quística alrededor del implante.



**Fig. 25. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de polímeros de Polipirrol.**

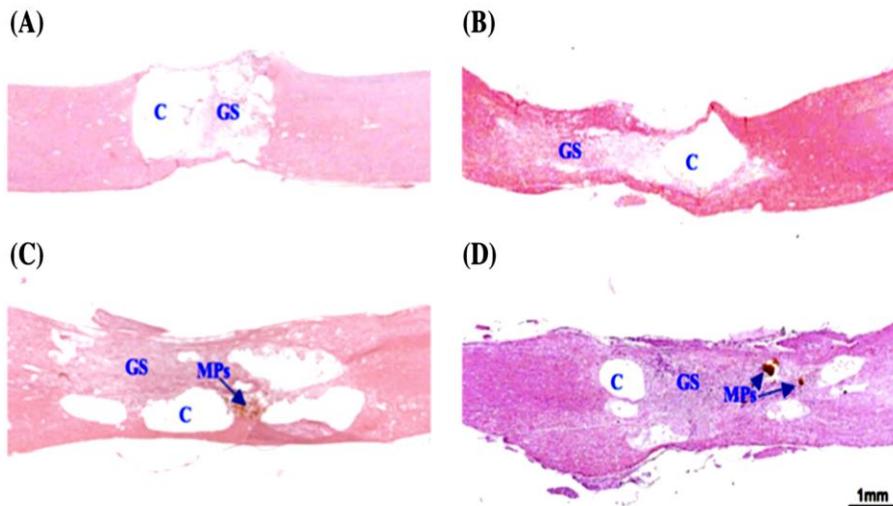
Se muestra la morfología de películas de Polipirrol (PPPy), Polipirrol – polietilenglicol (PPPy – PEG) y Polipirrol dopado con Yodo (PPPy/I). Puede notarse la diferencia en las características superficiales de cada uno (Tomado de (28)).



**Fig. 26. Fotografías y cortes histológicos con o sin implante en LSCME.**

*Paneles izquierda:* (A) Zona del corte transversal en animales control. Animal implantado con (C) Polipirrol dopado con Yodo o (E) Polipirrol copolimerizado con polietilenglicol. *Paneles derecha:* Cortes histológico con tinción de Luxol Fast Blue correspondientes al área de LSCME en animales control (B), animales implantados con (D) Polipirrol dopado con Yodo o (F) Polipirrol copolimerizado con polietilenglicol. Las flechas indican las zonas de quistes (Tomado de (76)).

Álvarez – Mejía y cols. (6), suministraron PPPy/I en un modelo de lesión traumática por contusión moderada de la médula espinal (LTME) probó mesopartículas (MPs) de PPPy/I sintetizadas vía energía de plasma combinada con rehabilitación en banda rotatoria (RBR). En este estudio se reportó que el implante de MPs presenta buena integración con el tejido huésped sin presentar un aparente rechazo inmunitario al ser implantados habiendo sido implantada por microinyección 48 horas después de realizar la LTME en ratas cepa Long - Evans. Aun cuando no se observó recuperación en el tejido nervioso, se observó que el implementar una terapia física ayudo a recuperar parte de la función motora perdida.



**Fig. 27. Cortes histológicos de médula espinal a 2 meses de LTME con tratamiento de mesopartículas de PPPy/I y rehabilitación física.**

Secciones longitudinales de médula espinal de ratas que muestran el epicentro de la zona lesionada, el tejido conservado y las cavidades quísticas formados 2 meses después de una LTME. (A) Vehículo: solución salina; (B) Vehículo - RBR: solución fisiológica con rehabilitación en banda rotatoria; (C) los MPs: implante de mesopartículas; (D) MPs - RBR: implante de mesopartículas más rehabilitación en banda rotatoria. Ampliación 29. Tinción de hematoxilina / eosina. Implante de mesopartículas de PPPy/I (MPs), (GS) Cicatriz glial; (C) Quiste (Tomado de (6)).

Sin embargo, tal y como lo muestran los estudios histológicos de Álvarez – Mejía y cols. (6), el proceso de microinyección presenta la gran desventaja de que el material se dispersa a lo largo del tejido tanto dañado como sano, lo cual puede significar una menor eficiencia en la activación de los procesos de plasticidad neuronal. Es por ello, que, al estudiar las características fisicoquímicas de este tipo de biomaterial derivado de pirrol, sería posible diseñar un vehículo que permita inmovilizar las MPs permitiendo optimizar las propiedades benéficas de neuroprotección y neuroregeneración estimuladas por el PPPy/I en LTME.

# **3. JUSTIFICACIÓN.**

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) conduce a la pérdida de la función motora a partir del sitio de lesión hacia miembros y órganos inferiores, lo cual impone una enorme carga socioeconómica tanto a los pacientes y sus familiares como para los sistemas de salud pública debido a que, hasta el momento, no existe un tratamiento o terapia eficiente para este tipo de padecimiento. Es por ello, que la búsqueda de alternativas que permitan detener los procesos post lesión de la médula espinal y con ello mejorar significativamente la calidad de vida de los individuos afectados, es hoy día una necesidad.

Estudios recientes han explorado los beneficios de la proteína de albúmina de suero como un agente terapéutico en modelos experimentales de daño en sistema nervioso central, atribuyendo su eficiencia debido a su capacidad neuroprotectora ante agentes de estrés oxidativo presentes en el sitio de lesión y, con ello, la obtención un cierto grado de recuperación funcional y preservación del tejido nervioso circundante al sitio dañado.

Por otra parte, se ha reportado que la microinyección de MPs de biomateriales poliméricos semiconductores sintetizados por plasma como el Polipirrol dopado con Yodo (PPPy/I), también han presentado actividad neuroprotectora y capacidad de estimular procesos plásticos en el tejido nervioso, esto último reflejándose en una recuperación funcional de los animales experimentales tratados, sin embargo, la desventaja de esta vía de suministro es la dispersión de las MPs a lo largo del tejido sano disminuyendo los beneficios de PPPy/I en el sitio mismo de la lesión.

El estudiar las propiedades fisicoquímicas superficiales de PPPy/I y el cómo estas se ven modificadas al usar la proteína albúmina como vehículo de suministro por microinyección en LTME y sus efectos en la recuperación funcional motora es la motivación para la realización del presente trabajo.

# 4. HIPÓTESIS.

El tratamiento combinado de partículas de polímeros de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados vía energía de plasma suspendidas en una solución de albúmina de suero, tendrá un efecto positivo en la recuperación motora en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas de la cepa Long - Evans.

# 5. OBJETIVOS.

## **5.1. Objetivo general.**

Evaluar el efecto del tratamiento combinado de partículas de polímeros de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados vía energía de plasma suspendidas en solución de albúmina de suero, en la recuperación funcional motora en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas de la cepa Long - Evans

### **5.1.1. Objetivos particulares.**

- ❖ Obtener dos polímeros de Polipirrol dopado con Yodo vía plasma con la variante de presencia o ausencia de agua en el proceso de síntesis.
- ❖ Realizar pruebas de caracterización morfológica y superficial a los polímeros sintetizados.
- ❖ Caracterizar el comportamiento superficial en películas de PPPy/I frente a diversas concentraciones de albúmina de suero bovina.
- ❖ Obtener el comportamiento reológico de polvos de PPPy/I suspendidos en soluciones de albúmina.
- ❖ Determinar qué combinación PPPy/I + albúmina presenta características adecuadas para el proceso de microinyección para el tratamiento de LTME.
- ❖ Evaluar la recuperación funcional en ratas Long - Evans con LTME moderada mediante los criterios de la escala Basso-Beattie-Bresnahan posterior a la microinyección de PPPy/I y/o albúmina en el sitio de lesión.

# **6. METODOLOGÍA.**

## 6.1. Reactivos.

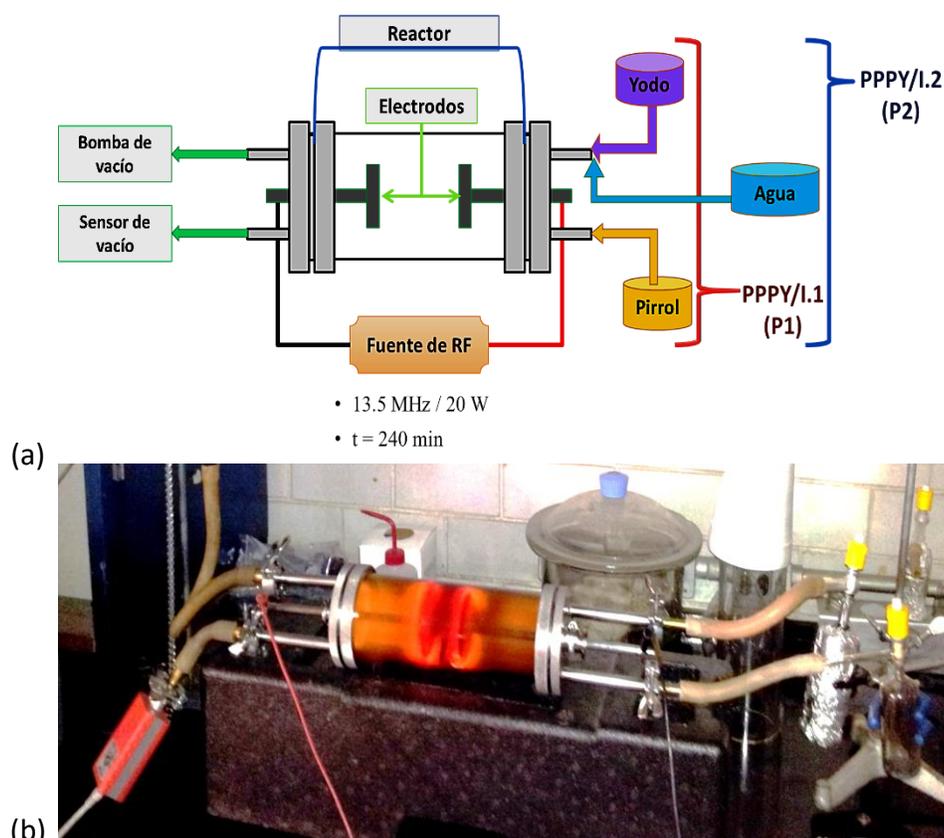
El monómero de Pirrol (Cat. 109-97-7), Yodo (Cat. 7553-56-2) y Acetona (Cat. 67-64-1) grado reactivo analítico, fueron adquiridos a Sigma – Aldrich Co. siendo usados directamente. La albúmina de suero bovino (BSA) y la albúmina de suero de rata (RSA), fueron adquiridas a Equitech – Bio, USA (Cat. BAH68 y RTSA). Asimismo, se empleó una solución amortiguadora de fosfato (PBS) de Corning Cellgro, USA (Cat. 46–013–CM).

El procesamiento histológico requirió parafina Paraplast X-Tra (Cat. P3808), Xileno (Cat. 1330-20-7), Etanol absoluto (Cat. 64-17-5), Galocianina (Cat. 1562-85-2), Floxina B (Cat. 18472-87-2), Sulfato de cromo (III) y potasio dodecahidratado (Cat. 7788-99-0), Ácido Fosfotungstico (Cat. 12501-23-4), Ácido acético (Cat. 64-19-7), Tetróxido de Osmio (Cat. 20816-12-0), Xilano (Cat. ), Ácido Clorhídrico fumante (Cat. 7647-01-0) marca Sigma – Aldrich Co. Medio de montaje Entellan® (Cat. 107961) marca Merck.

## 6.2. Síntesis de polímeros de Polipirrol dopado con Yodo vía energía de plasma.

Se realizó la síntesis por energía de plasma de dos biomateriales de Polipirrol dopado con Yodo, obteniendo películas delgadas en un sustrato de vidrio. La síntesis se realizó en un reactor tubular de vidrio de 9 cm de diámetro por 20 cm de longitud con una distancia entre electrodos de 8 cm (Fig. 28). Se aplicó una radiofrecuencia de superconducción de 13.5 MHz a 25 Watts de potencia. El sistema se mantuvo a una presión promedio de  $1.5 \times 10^{-2}$  Torr. En ambos casos, la síntesis requirió un tiempo de reacción de 240 min. Para PPPy/I.1 (P1) únicamente fue suministrando Pirrol y Yodo en intervalos de 6 y 4 minutos respectivamente (30, 75, 77). En el caso de PPPy/I.2 (P2), la síntesis varió al incorporar agua en el proceso de acuerdo con los intervalos de 6 minutos de Pirrol, 4 minutos de Yodo y 1 min de agua.

Una vez sintetizados los polímeros, las películas fueron recuperadas del sustrato con Acetona, almacenadas al vacío hasta su uso ya fuese como película delgada o en polvo, según fue requerido para su análisis.



**Fig. 28. Proceso de síntesis de PPPy/I.**

(a) Esquema representativo del sistema de reacción por energía de plasma para la síntesis de PPPy/I. (b) Imagen del reactor en funcionamiento.

### 6.3. Pruebas de caracterización fisicoquímicos.

#### 6.3.1. Caracterización superficial de P1 y P2.

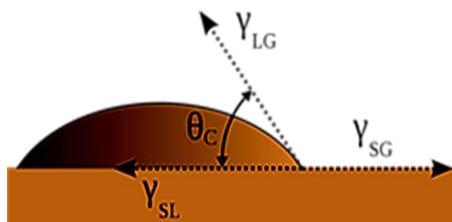
Películas delgadas de ambos polímeros fueron analizadas mediante un barrido de longitud de onda en el espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FT – IR) utilizando un

espectrofotómetro Perkin-Elmer FT 1600 con accesorio ATR, mientras que el resto de la película polimérica fue molida hasta obtener un polvo fino, al cual, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) utilizando los equipos Jeol JSM-5900LV (20 kV) y Jeol HRTEM-2100F (200 kV) respectivamente, asimismo, se realizó el correspondiente análisis elemental por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos – X (XPS) en un espectrómetro Thermo K-Alpha con monocromador de Rayos-X con fuente de Al K $\alpha$  (1486.6 eV).

### 6.3.2. Adsorción superficial de albúmina.

Portaobjetos cubiertos con P1 o P2 fueron inmersos en soluciones de concentraciones crecientes en el rango de 0 a 30 mg/mL de BSA disuelta en PBS a pH fisiológico. El tiempo de inmersión fue de 5 min a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Una vez concluido el tiempo de exposición, el exceso de BSA fue removido mediante lavados con PBS.

Los portaobjetos fueron almacenados al vacío en desecación por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se realizó el análisis de modificación superficial mediante la determinación del ángulo de contacto por el método estático, las fotografías fueron adquiridas con una cámara NIKON modelo D - 5100 y se analizaron mediante el software ImageJ Versión 1.50 (desarrollado por el National Institutes of Health, EUA) con el cual se determinó el ángulo formado entre la película y una gota de agua Milli-Q® (Fig. 29).



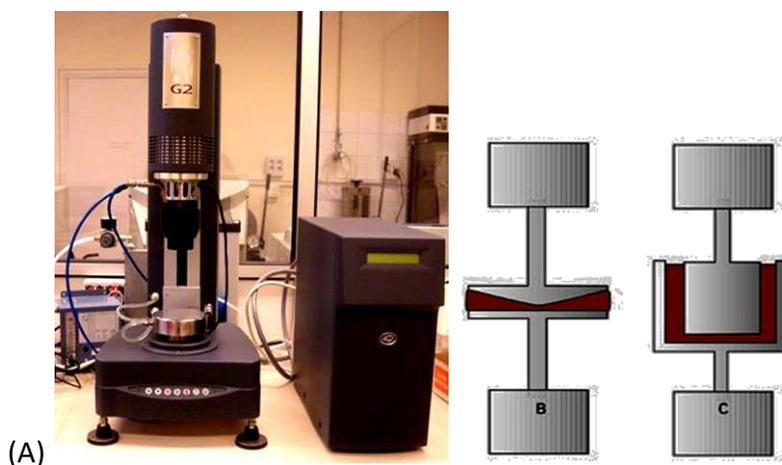
**Fig. 29. Análisis de ángulo de contacto para evaluar la capacidad de un líquido a extenderse sobre una superficie.**

Las  $\gamma$ 's representan la tensión superficial interfacial entre el sólido y el vapor (SG), líquido y sólido (LS); y de líquido y vapor (LG), el ángulo de intersección entre  $\gamma_{LG}$  y  $\gamma_{SL}$  corresponde al ángulo de contacto ( $\theta$ ) (Tomado de (15)).

## 6.4. Pruebas de flujo.

Las pruebas de flujo fueron desarrolladas en un reómetro AR – G2 (TA Instrument, USA, Fig. 30), con una capacidad de detección de torque de  $0.003 \mu\text{Nm}$  con una resolución de  $0.1 \text{ nNm}$ . La prueba se desarrolló en la región viscoelástica lineal en un 95 % de esfuerzo controlado en las modalidades de cizallamiento simple en un rampeo de  $0.1$  a  $100 \text{ s}^{-1}$  así como de cizallamiento oscilatorio en frecuencia de  $0.1$  a  $100 \text{ rad/s}$ .

La prueba consistió en suspender  $10 \text{ mg}$  de P1 o P2 en una solución conteniendo  $0, 7, 14$  o  $21 \text{ mg}$  de BSA por mL de PBS a pH fisiológico. Las geometrías utilizadas consistieron en cilindros concéntricos de doble espacio (gap) (gap de  $500 \text{ micrones}$ ), así como de cono y plato ( $60 \text{ mm}$  de diámetro, cono con pendiente de  $1^\circ$  y  $36 \text{ micrones}$  de truncamiento). Las determinaciones se realizaron a  $25$  y  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , las cuales fueron controladas por un sistema de recirculación de agua (RTE – 110 Endocal, UK). Los datos fueron adquiridos con el software Rheology Advantage Data Analysis TA Instruments software Versión 3.3.4, analizados y graficados en GraphPad Prisma® Versión 7.0.



**Fig. 30. Configuración para estudios reológicos.**

(A) Equipo AR – G2 de esfuerzos controlados, geometrías de (B) cono y plato, y (C) cilindros concéntricos o doble gap.

## **6.5. Pruebas *in vivo*.**

### **6.5.1. Lineamientos para pruebas *in vivo* con LTME.**

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron con apego a las normas y lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (78).

### **6.5.2. Cepa Long - Evans como modelo de LTME.**

En este estudio se emplearon ratas hembra de la cepa Long - Evans también llamadas ratas con capucha o "Hooded rat", las cuales son resultado de la entrecruza entre ratas hembra blancas del Instituto Wistar con ratas macho grises silvestres.

Estas ratas son comúnmente utilizadas en estudios de neurología, toxicología y oftalmología. Su uso es debido a que presentan una mayor resistencia a enfermedades respiratorias en comparación con las ratas albinas, por lo que la rata Long - Evans es un buen modelo para procedimientos quirúrgicos que requieren un uso prolongado de anestésico.

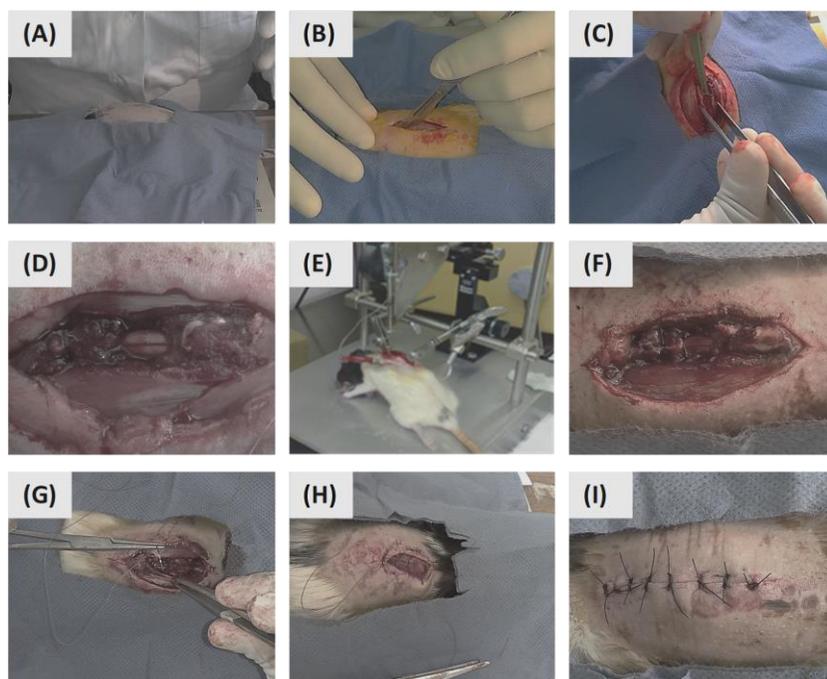
### **6.5.3. Modelo de lesión traumática de médula espinal.**

Se emplearon ratas hembra de la cepa Long - Evans de 12 a 14 semanas de edad, peso corporal entre 250 y 300 g sin procedimientos experimentales previos. Previo a la cirugía, los animales fueron anestesiados vía intramuscular con una mezcla de Ketamina y Xilacina (77.5 mg y 12.5 mg respectivamente por cada kilogramo de peso corporal) seguido de los protocolos de asepsia y antisepsia. La cirugía tuvo por objetivo realizar una hemilaminectomía a nivel de la vértebra torácica nueve dejando expuesta la médula espinal, esta fue lesionada mecánicamente al dejar caer un cilindro de 5 g desde una altura de 25 mm mediante el equipo NYU Impactor

generando una LTME por contusión de tipo moderada. La lesión fue verificada al observarse la formación de un hematoma subdural y un registro de error computarizado menor al 10 %.

A continuación, el músculo, la fascia y la piel fueron suturados (Fig. 31). Se permitió que los animales se recuperaran del anestésico para suministrarles vía intramuscular un antibiótico (Penicilina Benzatínica de 1'200,000 UI) y un antiinflamatorio (5 mL de Paracetamol por cada 2 L de agua en bebedero) como analgésico durante 3 días. Cada animal fue colocado en una caja individual donde fueron alimentados bajo dieta comercial y agua a *ad libitum*.

Como parte de los cuidados post – operatorios, durante los primeros 15 días fue necesaria la observación diaria con la finalidad de realizar vaciado manual de vejiga hasta recuperar la autonomía. A lo largo de las ocho semanas de evaluación también se realizaron estiramientos de extremidades para evitar que estas se anquilosaran, así como efectuar curaciones debido a irritación de la piel y aparición de llagas por presión.



**Fig. 31. Proceso de lesión de médula espinal mediante NYU impactor.**

(A) Localización de T9 (B) Disección de piel y aponeurosis (c) Laminectomía, (D) Médula expuesta, (E) Montaje en NYU Impactor para generar la LTME, (F) Hematoma en zona medular y (G - I) Sutura por planos.

#### 6.5.4. Prueba de concentración de BSA en LTME moderada.

Esta prueba incluyó 15 ratas con LTME moderada distribuidas en cinco grupos de acuerdo con la Tabla 13. A cada grupo se suministró por microinyección en el sitio lesionado, una solución de 10  $\mu$ L de BSA en PBS a pH fisiológico una vez transcurridas 48 horas post lesión y un puntaje no mayor a 1 en la escala Basso – Beattie – Bresnahan (A.3.) (79).

Tabla 13. Grupos para prueba de concentración de BSA.

Grupo	Concentración de BSA (mg/mL)	n
I	0	3
II	7	3
III	14	3
III	21	3

#### 6.5.5. Diseño experimental y microinyección de suspensiones de PPPy/I y RSA en LTME.

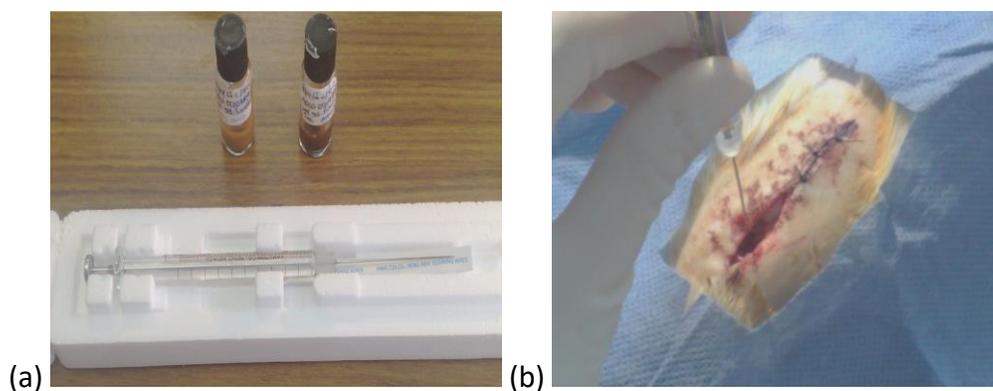
Se siguió un diseño experimental  $2^K$ , donde  $k = 3$  que correspondió al número de factores a evaluar, siendo éstos lesión (LTME), polímero (P1 o P2) y albúmina (RSA), requiriendo 2 niveles para cada uno (presencia = 1 o ausencia = 0). De acuerdo con este diseño se formaron 7 grupos experimentales por polímero, cada uno constó de seis ratas hembra seleccionadas aleatoriamente. El tipo de tratamiento por grupo se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Grupos experimentales para prueba de albúmina y polímero en LTME.

Grupo	Lesión	Polímero	Albúmina
V (vehículo)	0	0	0
LTME	1	0	0
P1 o P2	0	1	0
RSA	0	0	1
LTME + P1 o P2	1	1	0
LTME + RSA	1	0	1
LTME + P1 o P2 + RSA	1	1	1

### 6.5.6. Administración del tratamiento experimental.

A las 48 horas post lesión y una vez anestesiados los animales de experimentación, nuevamente se expuso la médula espinal para suministrar el tratamiento correspondiente (Tablas 13 y 14), por microinyección directamente en la zona de lesión mediante una jeringa Hamilton 710RN de 100  $\mu$ L (Fig. 32), el volumen suministrado correspondió a 10  $\mu$ L. Asimismo, los grupos control, es decir, aquellos que no recibieron lesión, también fueron microinyectados de acuerdo con el tratamiento correspondiente.



**Fig. 32. Microinyección de tratamiento.**

(a) Viales de P1 y P2 en suspensión más jeringa Hamilton. (b) Microinyección de suspensión a las 48 horas.

### 6.5.7. Evaluación funcional de los animales.

Todos los animales fueron evaluados a las 24 y 48 h subsecuentes a la lesión para corroborar la ausencia de movimiento en extremidades inferiores, posteriormente se realizó un seguimiento de ocho semanas, evaluando el progreso una vez por semana de acuerdo a los lineamientos (A.3.) y formato (A.4.) de la escala BBB (79), dicha valoración se realizó por 3 observadores cegados con valor de 0.7 de coeficiente kappa de Cohen.

### **6.5.8. Criterios de exclusión.**

Fueron excluidos del estudio aquellos animales experimentales que presentaran alguna de las siguientes características:

- Hematoma lateralizado con respecto a la zona central de lesión,
- No concluyeron el tiempo de evaluación correspondiente a ocho semanas,
- Obtuvieron un valor de BBB mayor a 1 dentro de las primeras 24 – 48 horas post lesión,
- Alcanzaron un valor de BBB mayor o igual a 6 en la primera semana de evaluación,
- Presentaron anquilosis,
- Autofagia.

## **6.6. Pruebas ex vivo.**

### **6.6.1. Estudios morfológicos.**

Al concluir el seguimiento clínico de ocho semanas y previamente anestesiados, los animales de experimentación fueron inyectados con 1,000 UI de heparina para ser sometidos a una toracotomía amplia con la finalidad de canular la arteria aorta ascendente, por esta vía, fueron perfundidas a una velocidad de 30 ccm vía intracardiaca mediante una bomba peristáltica haciendo pasar por ellas un volumen de 200 mL de una solución fisiológica hasta blanquear al animal, seguido de una solución fijadora de Karnosky (A.5.).

Una vez fijados los tejidos, se extrajo la médula espinal acotando la muestra a 2 cm de longitud abarcando a partir del sitio de lesión 1 cm tanto en dirección caudal como en dirección cefálica. Estas muestras fueron procesadas hasta su inclusión en parafina y correspondiente análisis morfo - histológico.

Transcurridas 24 h de post fijación en una relación 1:10 veces el volumen del tejido, las muestras fueron lavadas con recambios de PBS 0.1 M a pH 7.2, hasta eliminar el aroma de la

solución de fijación. Posteriormente se procedió a deshidratar las muestras en una secuencia de alcoholes del 30 al 100 % de alcohol etílico, seguido por 3 aclarados con Xileno con la subsiguiente inclusión en parafina histológica.

Una vez incluidas las muestras estas fueron cortadas en un grosor de 7  $\mu$ , los cortes fueron colocados en laminillas xilanizadas y posteriormente fueron teñidas de acuerdo con el procedimiento de Lapham y cols. (A.6.) (80).

### **6.6.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).**

Los estudios de RMN se desarrollaron en un equipo experimental Varian de 7 Teslas para imagenología y espectroscopía de resonancia magnética en pequeñas especies, en el cual fueron observadas médulas *ex vivo* en post fijación de los grupos V, LTME, LTME+P.1 o 2 y LTME+P.1 o 2+RSA con dimensiones promedio de 6.3 mm de diámetro por 2 cm de largo teniendo por referencia la zona correspondiente al epicentro de LTME.

Para dicho estudio fue requerida una secuencia de eco de gradiente estándar con los siguientes parámetros de adquisición: TE/TR = 4/15 ms, FOV = 60 x 60 mm, ángulo = 20°, matriz: 256 x 256, NEX = 6. Los datos obtenidos fueron almacenados en formato DICOM posteriormente, estos fueron analizados y reconstruidos mediante el software Amira® de Thermo Scientific.

### **6.6.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM).**

Muestras de tejido fueron lavadas con recambios de PBS 0.1 M a pH 7.2, hasta eliminar el aroma de la solución de fijación. A continuación, las muestras fueron cortadas por la mitad con una navaja histológica y colocadas en un tubo tipo Eppendorf junto con Tetróxido de Osmio por 30 min, transcurrido el tiempo de exposición se procedió a realizar el pase por tren de alcoholes hasta llegar a alcohol absoluto. Posteriormente, las muestras se llevaron a desecación mediante

CO<sub>2</sub> a punto crítico. Las muestras fueron montadas, recubiertas con oro y almacenadas en desecación hasta su observación en un microscopio JSM - IT100HR InTouchScope (Jeol, USA).

### **6.7. Análisis gráfico y estadístico.**

GraphPad Prism® (7.0) [Software] (2016) fue la herramienta requerida para la graficación y análisis de los datos obtenidos. El estudio estadístico consistió en un análisis de varianza de medias repetidas, seguido de las pruebas de Tukey y Dunnett considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Con el mismo software fueron realizados los análisis de regresión lineal, así como las pruebas de pendientes con grado de significancia de  $p < 0.05$  requeridos por los datos reológicos.

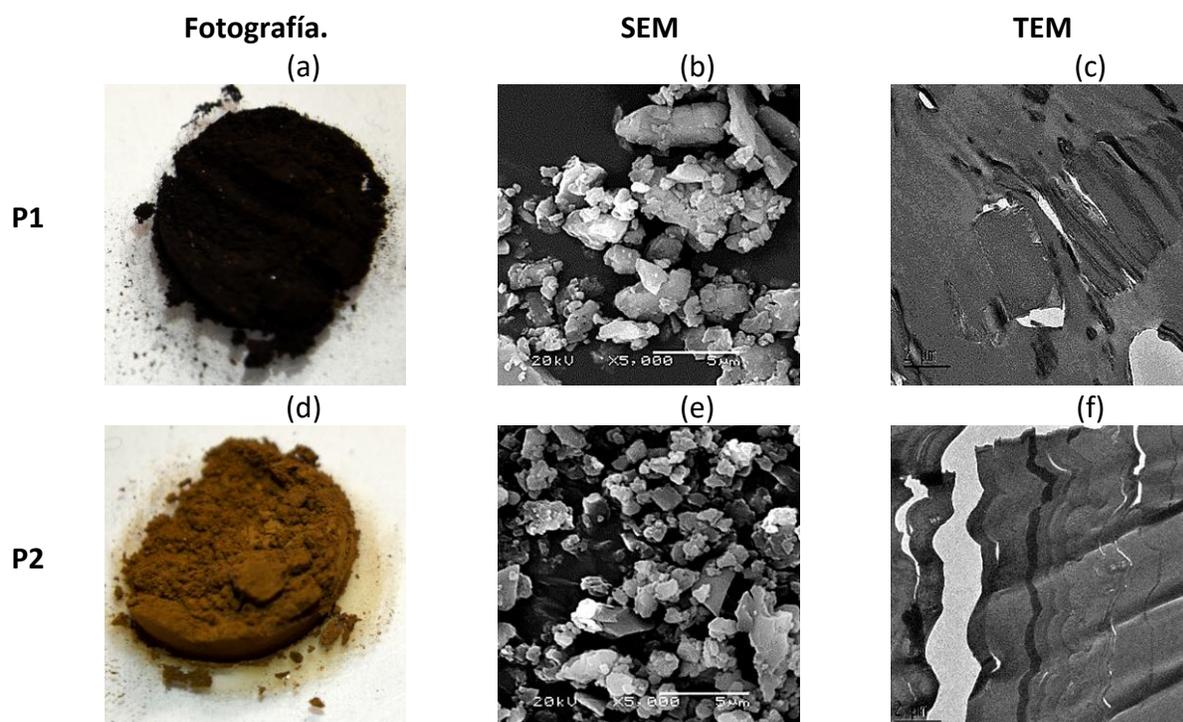
La graficación y análisis por deconvolución de los picos obtenidos en el análisis elemental (XPS) de los polímeros P1 y P2, se realizaron con OriginPro® (8.1) [Software] (2016).

# 7. RESULTADOS: CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA.

## 7.1. Análisis morfológico de P1 y P2

Diferentes aspectos morfológicos de los polvos de P1 y P2 (Fig. 33). En ambos materiales pueden observarse una notable diferencia en la coloración como una consecuencia de la cantidad de Yodo (Tabla 15) presente en la estructura polimérica.

En las micrografías SEM, pueden observarse partículas de diversos tamaños y forma (Fig. 33b y 33e) que en apariencia no presentan diferencia superficial alguna como resultado del proceso de síntesis, mientras que en las micrografías por TEM (Fig. 33c y 33f), se observa el capeado formado durante el proceso de síntesis del biomaterial, de forma tal, que en P2 es posible apreciar un depósito del material aparentemente más ordenado que en P1.

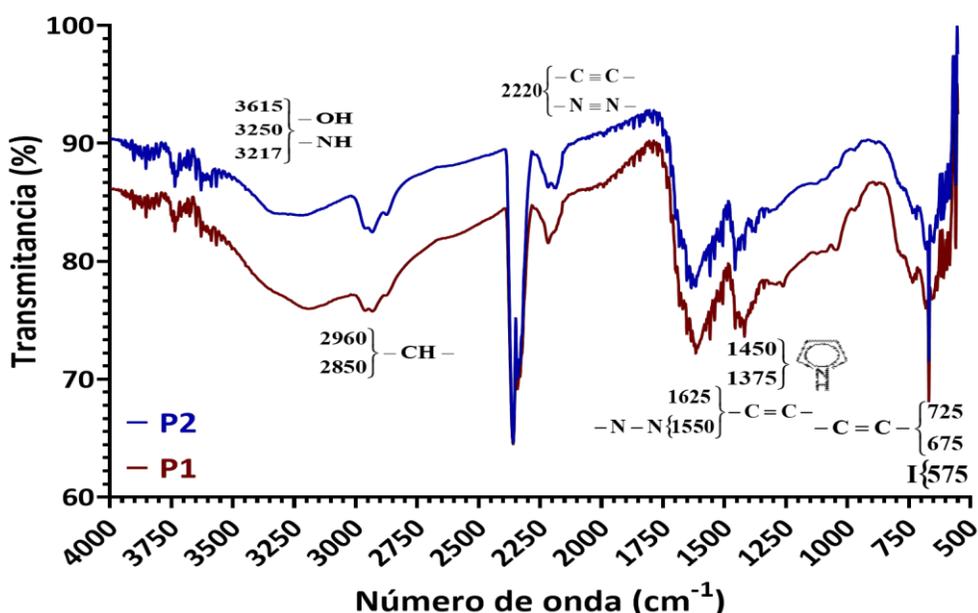


**Fig. 33. Imágenes representativas de polvos de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados por plasma (PPy/I).**

Fotografía del polvo de P1 (a) y P2 (d), microfotografías SEM (barra de 5  $\mu\text{m}$ ) y TEM (barra de 2  $\mu\text{m}$ ) de polvo del PPy/I.

## 7.2. Espectroscopia infrarroja (FT-IR) de P1 y P2

Ambas películas de PPPy/I fueron analizadas mediante FT-IR previo a su molienda. El espectro obtenido (Graf. 1) muestra la presencia de grupos O - H, N - H y C - H en las bandas de 3,615; 3,350 y 3,217  $\text{cm}^{-1}$ ; en la zona de los 3,500 a 3,000  $\text{cm}^{-1}$  pueden localizarse funciones derivadas de aminas tales como - NH<sub>2</sub>, = NH y - NH que pudieran estar sobre puestas con las funciones antes mencionadas. Los picos en 2,960 y 285  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de - CH<sub>2</sub> y - CH<sub>3</sub>. Las siguientes dos bandas corresponden a uniones alifáticas del tipo C - H; seguidos por los picos corresponden a enlaces múltiples del tipo C = O en 2361  $\text{cm}^{-1}$ , C  $\equiv$  C y C  $\equiv$  N ambas absorciones en 2,220  $\text{cm}^{-1}$ . La presencia de grupos funcionales insaturados sugiere la pérdida de átomos de hidrogeno durante el proceso de síntesis. Los picos localizados en 1,625 y 1,550  $\text{cm}^{-1}$  se asocian a enlaces conjugados tipo C = C que en conjunto con los picos centrados en 1,450 y 1,375  $\text{cm}^{-1}$  son característicos de la fragmentación de la molécula de pirrol. Por otro lado, en la misma banda de 1,550  $\text{cm}^{-1}$  se sobre lapa con la señal generada por enlaces tipo N - H. Asimismo, la banda encontrada entre 1,040 y 1,150  $\text{cm}^{-1}$  se asocia a grupos C - OH. Por otro lado, tanto el pico en 725  $\text{cm}^{-1}$  como el de 675  $\text{cm}^{-1}$ , constatan la presencia de grupos C = C. Por último, un hombro ubicado en 575  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al Yodo que actúa como dopante en la síntesis de ambos PPPy/I.

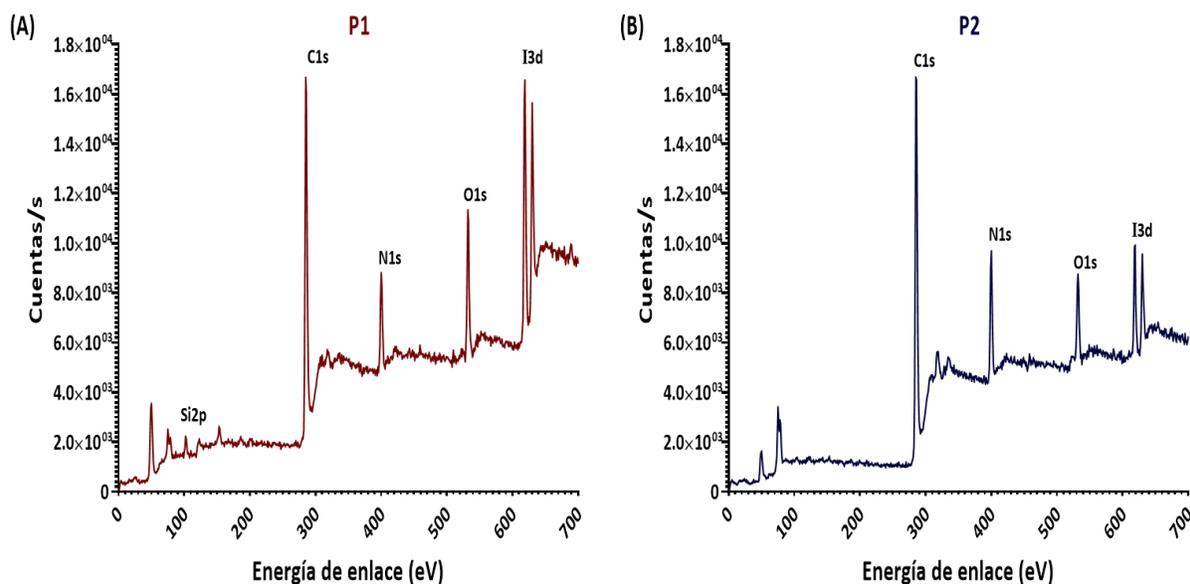


Graf. 1. Bandas en el espectro infrarrojo de P1 y P2

### 7.3. Análisis elemental de P1 y P2.

Graf.2 corresponde al espectro de la medición de energía de enlace elemental mientras que en la Tabla 15 se muestran las composiciones elementales en porcentaje atómico de los elementos Carbono (C), Nitrógeno (N), Oxígeno (O) y Yodo (I) en P1 y P2 determinada por XPS. Los elementos C y N provienen del monómero de pirrol (Fig.34), cuya relación C/N = 4 de la molécula de pirrol se modifica durante el proceso de polimerización, obteniendo por resultado una relación final de C/N de 6.17 y 5.48 para P1 y P2 respectivamente.

En dicho análisis también se detectó la presencia de átomos de I (Graf. 2), los cuales pueden estar unidos covalentemente o atrapados en forma iónica como dopantes en la red polimérica formada.



**Graf. 2. Espectro de la medición de energía de enlace elemental por XPS en partículas de PPPy/I.**

Tabla 15. Análisis elemental en porcentaje (%) atómico por XPS para P1 y P2.

Elemento (X)	% atómico		Relación		
	P1	P2	$A = \left(\frac{X}{N}\right)_{P1}$	$B = \left(\frac{X}{N}\right)_{P2}$	$\frac{A}{B}$
Carbón	70.3	76.7	6.17	5.48	1.13
Nitrógeno	11.4	14.0	---	---	---
Oxígeno	11.1 (1.3) *	6.9	0,97 (0.11) *	0.49	1.98 (0.22) *
Yodo	1.7	0.7	0.15	0.05	3.0
Silicio	4.9	0.0	0.43	0.00	430.0
Otros	0.58	1.7	0.05	0.12	0.42
Total	100	100			

Nota: Los valores con asterisco (\*) corresponden al ajuste por presencia de SiO<sub>2</sub>.

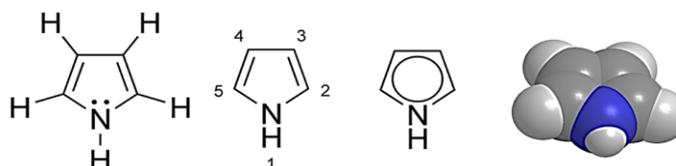


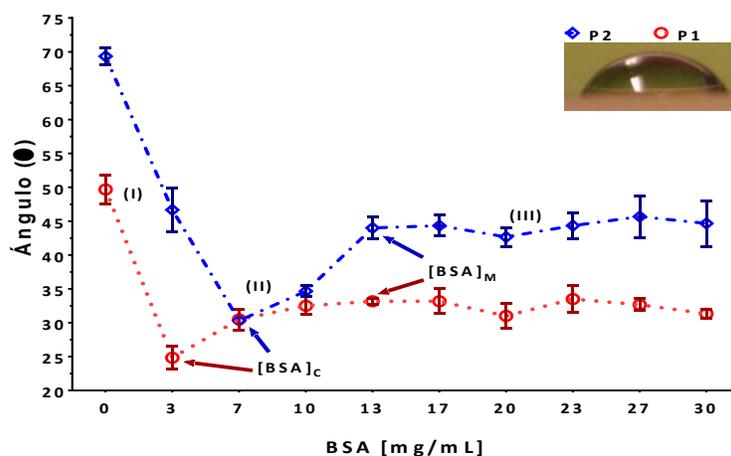
Fig. 34. Diferentes representaciones de la estructura heterocíclica del pirrol.

#### 7.4. Adsorción de albúmina de suero bovina (BSA) sobre películas delgadas de P1 y P2

El comportamiento del ángulo de contacto ante la exposición de películas de P1 y P2 a diferentes concentraciones de BSA se muestra en la Graf. 3, puede observarse que conforme incremento la concentración de BSA, el desempeño de la química superficial cambia debido a la adsorción de proteína por la superficie del polímero, lo que resulta en una variación en el ángulo de contacto. En este estudio, se observó un punto de concentración crítica para BSA ([BSA]<sub>c</sub>), en el cual el ángulo de contacto crece hasta un media para cada polímero.

También es posible observar la formación de tres diferentes regiones de interacción polímero – proteína (Tabla 16): (I) asociada con la formación de una monocapa desde el ángulo inicial hasta [BSA]<sub>c</sub>; (II) asociada con la formación de un sistema de proteínas multicapa que

comienza en  $[BSA]_c$  hasta el comienzo de la (III), y la última se caracteriza por el establecimiento de una región en la que el ángulo muestra una tendencia a la independencia de la concentración de BSA a partir de una concentración máxima de BSA absorbida ( $[BSA]_M$ ).



**Graf. 3. Ángulo de contacto de agua sobre películas de PPPy/I expuestas a BSA.**

(I, II y III) Indican las tres diferentes regiones del comportamiento de BSA al interactuar con PPPy/I. asimismo, se encuentra el punto de concentración crítica mínima de BSA para la formación de monocapa ( $[BSA]_c$ ). Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar.

**Tabla 16. Regiones establecidas por la interacción de BSA con PPPy/I.**

Región	Ángulo ( $\theta^\circ$ )	BSA [mg/mL]
I	70 – 20	0 – 7
II	20 – 45	7 – 13
III	25 – 55	13 – 30

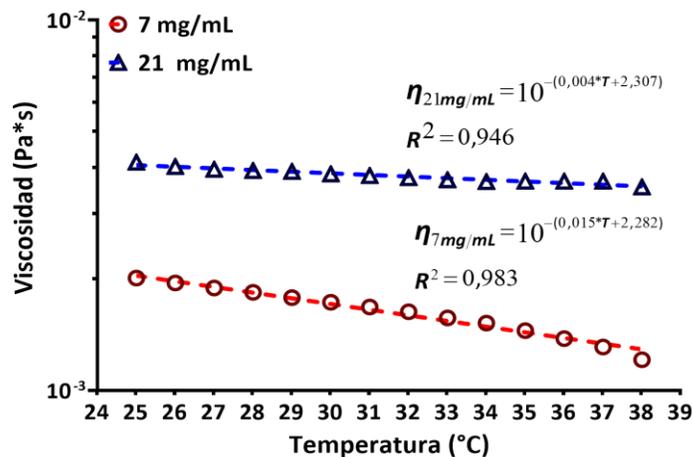
# 8. RESULTADOS: PRUEBAS DE FLUJO.

## 8.1. Albúmina de suero bovina (BSA)

### 8.1.1. Estabilidad térmica de BSA.

En una solución proteica se producen cambios conformacionales cuando existen modificaciones de pH, alteraciones en la concentración iónica o variaciones bruscas de temperatura, las cuales, afectan la solubilidad de proteínas hasta el punto de producir su precipitación debido a cambios conformacionales (62, 81, 82). Esta variación de la conformación se denomina desnaturalización, la cual, no afecta a los enlaces peptídicos por lo que, en algunos casos, al volver a las condiciones normales puede recuperarse la conformación proteica inicial o renaturalización.

Por lo antes mencionado, fue de importancia el verificar la estabilidad conformacional ante cambios térmicos de la proteína BSA en solución. Para ellos, se estudiaron las soluciones de menor y mayor concentración de BSA en un barrido de temperatura (T) de 25 a 38 °C bajo condiciones de cizallamiento simple (Graf. 4).

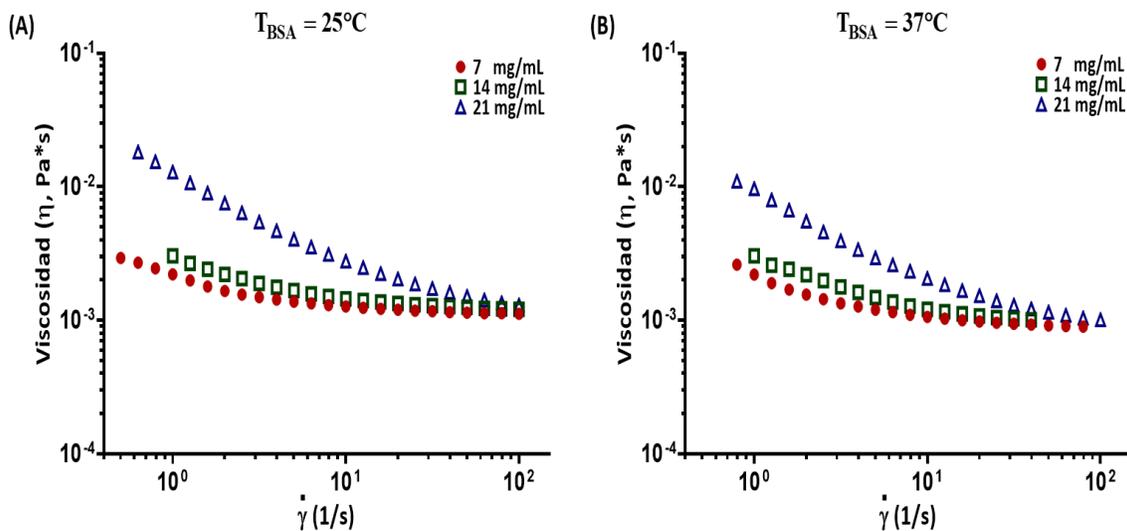


**Graf. 4. Comportamiento de la viscosidad de BSA en barrido de temperatura bajo cizallamiento simple.**

Regresión no lineal (- -) para los cambios de viscosidad de BSA en un barrido de temperatura entre 25 y 38 °C. Puede apreciarse una mayor caída de la viscosidad para la solución de 7 mg/mL respecto a la de 21 mg/mL. El análisis de las pendientes muestra que para 21 mg/mL no existe diferencia significativa dentro del mismo grupo de datos ( $p = 0.226$ ), pero sí entre las pendientes de ambas concentraciones ( $p < 0.05$ ).

### 8.1.2. Cizallamiento simple de BSA.

En la Graf. 5 pueden observarse las curvas de viscosidad contra velocidad de cizallamiento, correspondiente a tres concentraciones de BSA (7, 14 y 21 mg/mL) tanto a (a) 25°C como a (b) 37°C. Se aprecia un comportamiento reo-espesante conforme disminuye la velocidad de cizallamiento, siendo más evidente para la concentración de 21 mg/mL en ambas temperaturas ensayadas.



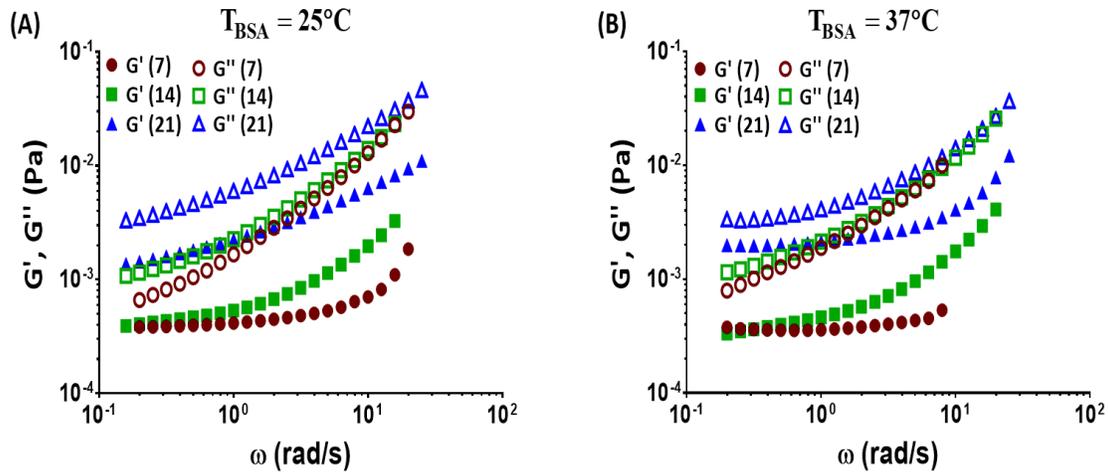
**Graf. 5. Comportamiento viscoso de BSA bajo cizallamiento simple.**

Estudio reológico bajo cizallamiento simple de soluciones de BSA. Las concentraciones probadas fueron de 7 (●), 14 (□), o 21 (Δ) mg de BSA por mL de PBS a T = 25 °C (a) y T = 37 °C (b), respectivamente.

### 8.1.3. Cizalla oscilatoria de BSA.

Después de determinar la estabilidad de la proteína a las temperaturas de interés, se llevó a cabo un estudio reológico en cizalla oscilatoria a concentraciones de 7, 14 y 21 mg/mL de BSA en PBS (Graf. 6), en todos los casos el módulo elástico ( $G'$ ) mostró una tendencia de independencia a bajas frecuencias, siendo este más notorio cuando las soluciones están a

temperatura corporal (Graf. 6 b). Lo cual, permite establecer la posibilidad de la existencia de un sistema estructurado mediado por la interacción existente entre los grupos residuales expuestos por la proteína albúmina en el medio de suspensión en conjunto con la presencia de iones proporcionados por el PBS.



**Graf. 6. Curvas de cizallamiento oscilatorio de BSA a 25 y 37 °C.**

Curvas de los módulos elástico ( $G'$ ) y ( $G''$ ) a diferentes concentraciones de BSA en las soluciones ensayadas. Los símbolos refieren a 7 (●), 14 (■), o 21 (▲) mg de BSA por mL de PBS a  $T = 25^\circ\text{C}$  (a) y  $T = 37^\circ\text{C}$  (b), respectivamente.

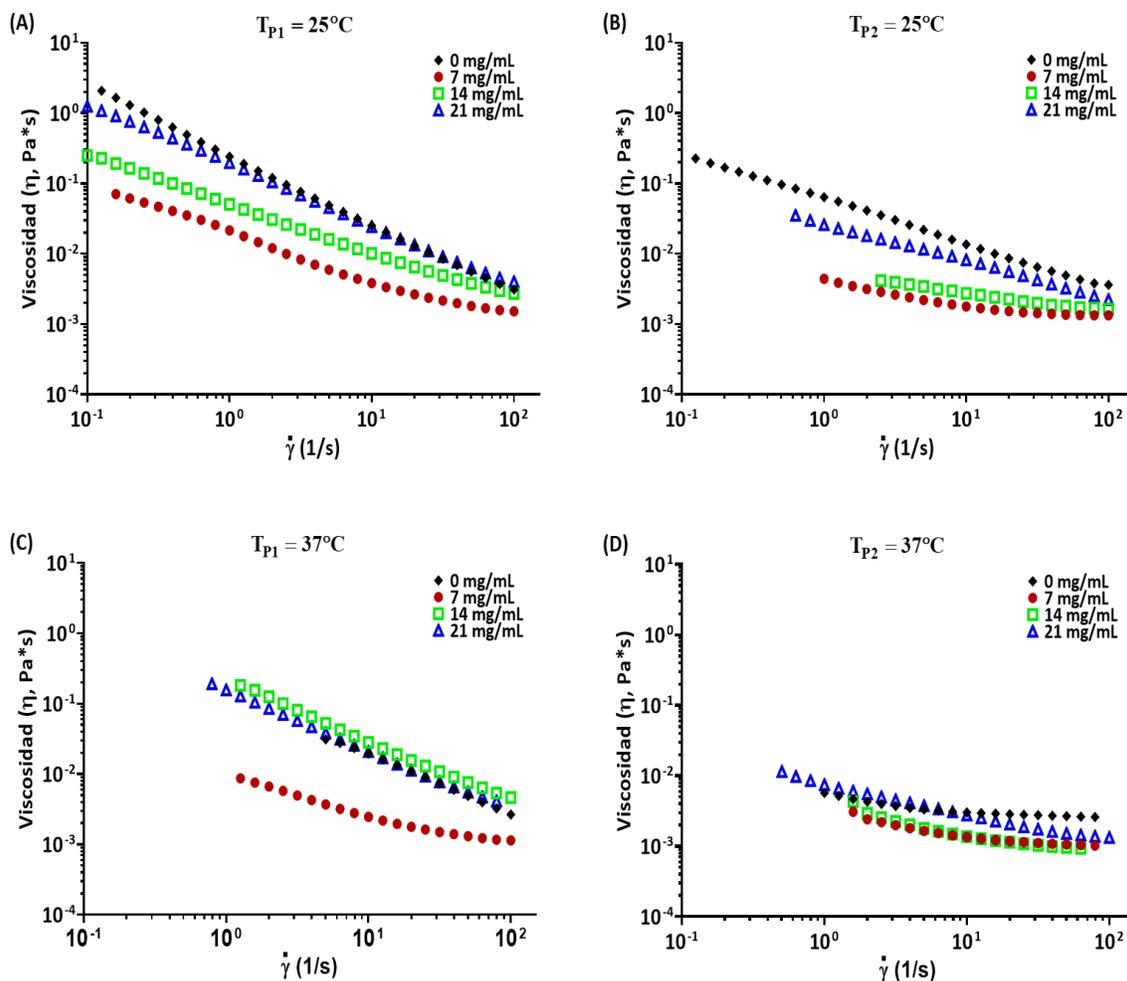
## 8.2. Combinación de BSA y P1 o P2.

### 8.2.1. Cizallamiento simple de suspensiones combinadas.

La Graf. 7 presenta la curva de viscosidad frente a la velocidad de cizallamiento bajo cizallamiento simple, para el caso de suspensiones de partículas de P1 o P2 en soluciones de BSA a diferentes concentraciones ensayadas a dos temperaturas ( $T = 25$  y  $37^\circ\text{C}$ ).

En todos los casos, se obtuvo un comportamiento viscoso reo-adelgazante (conocido como “shear thinning”) conforme incremento la velocidad de cizallamiento. Indicando que la combinación albúmina – polímero en suspensión presentan una estructuración interna y que el arreglo de esta estructura depende de la velocidad de corte a la cual este sometida la suspensión.

Por otro lado, el rango de medición del reómetro no permitió obtener la viscosidad a una velocidad de cizalladura menor a la aquí mostrada, sin embargo, los datos obtenidos muestran que bajo estas condiciones es posible microinyectar las combinaciones a una velocidad de cizalladura elevada y luego, al final del proceso de microinyección, la viscosidad de las suspensiones aumentará en varios órdenes de magnitud.

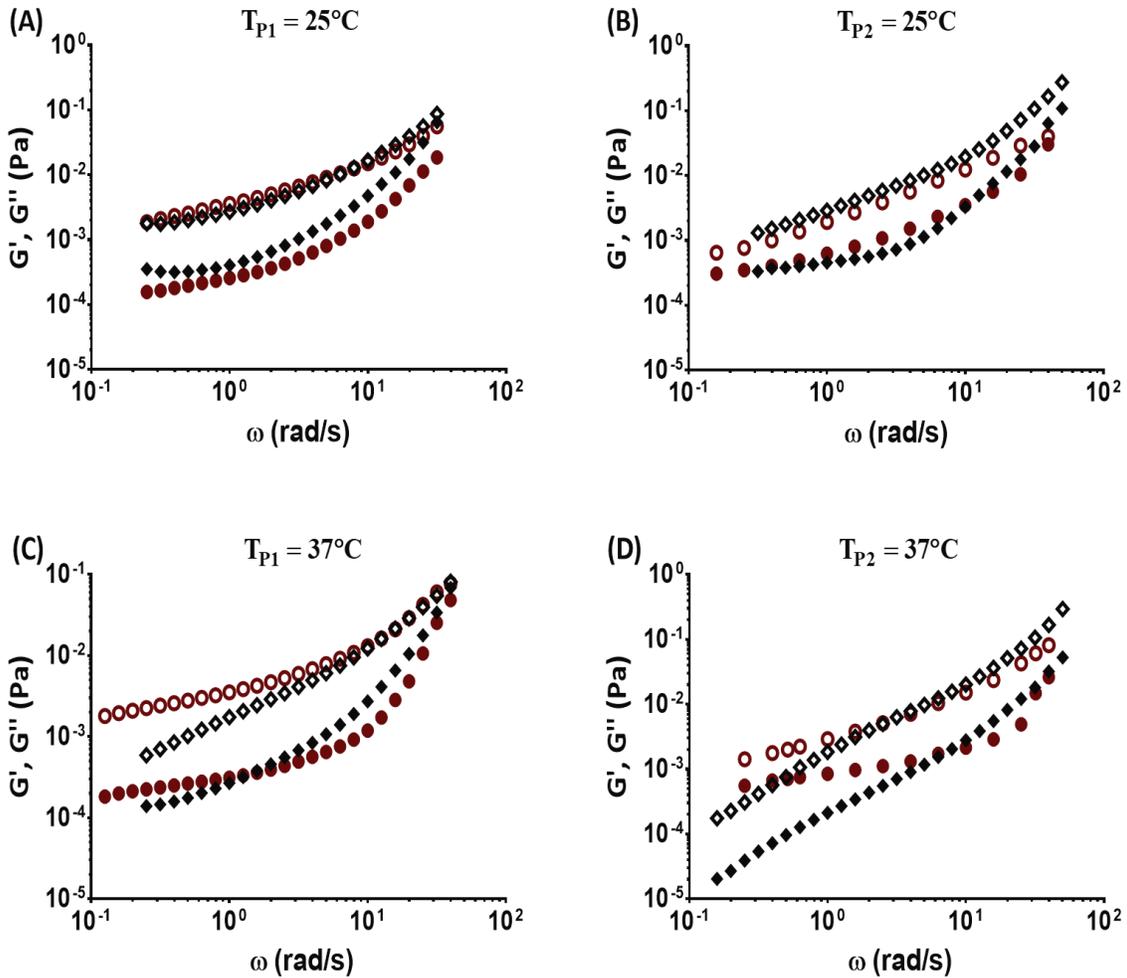


**Graf. 7. Comportamiento viscoso de suspensiones de PPPy/I en BSA bajo cizallamiento simple.**

Estudio reológico de la viscosidad en cizallamiento simple de suspensiones de P1 (a y b) y P2 (c y d) en soluciones de BSA. Todas las suspensiones consistieron en 10 mg por mL de P1 o P2 y adicionalmente 0 (◆), 7 (●), 14 (□) o 21 (Δ) mg de BSA por mL de PBS. (a y b)  $T = 25^{\circ}\text{C}$  y (c y d)  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

### 8.2.2. Cizallamiento oscilatorio de suspensiones combinadas.

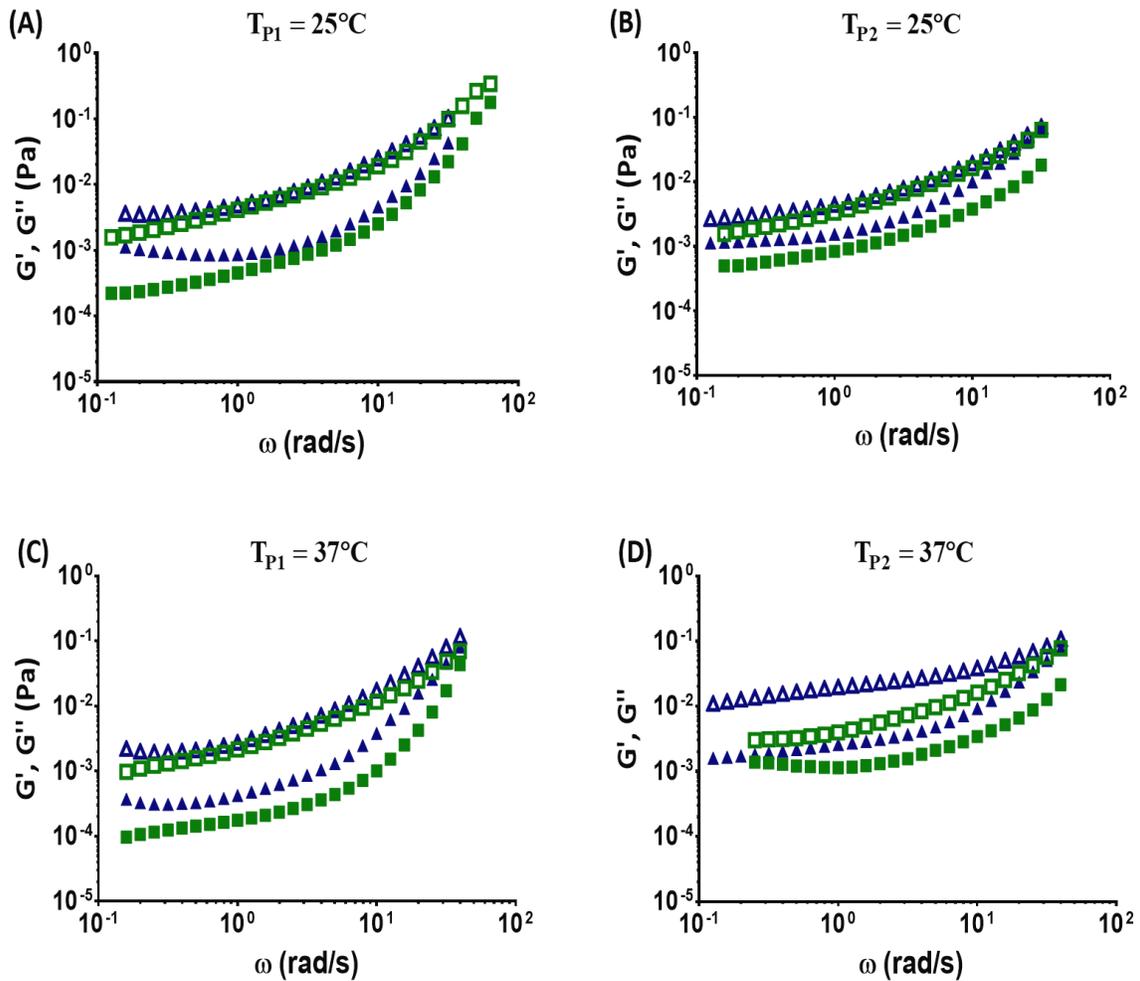
Las Graf. 8 y 9 muestra los resultados de los experimentos dinámicos para las mismas suspensiones de partículas. Cada gráfica corresponde al módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) en función de la frecuencia a 25 y 37 °C. En 25 °C (Graf. 8), todas las suspensiones muestran una tendencia a establecer una zona de independencia a la frecuencia, comportamiento parecido a un sistema con estructuración (*solid - like*) en el seno de la suspensión (34).



**Graf. 8. Curvas de cizallamiento oscilatorio de PPPy/I para 0 y 7 mg/mL BSA.**

Estudio reológico en cizallamiento oscilatorio de suspensiones de PPPy/I con y sin BSA en soluciones. Los símbolos llenos corresponden al módulo elástico ( $G'$ , Pa) y los símbolos vacíos representan el módulo de pérdida ( $G''$ , Pa), todas las suspensiones contienen 10 mg por ml de P1 o P2. Las concentraciones de BSA corresponden a 0 (♦, ◇), 7 (●, ○), 14 (■, □) y 21 (▲, △) mg/mL, las temperaturas ensayadas fueron de  $T = 25^\circ\text{C}$  (A y B) y  $T = 37^\circ\text{C}$ . (C y D).

Cuando la temperatura incrementa hasta los 37 °C (Graf. 9), la suspensión de polímero sin BSA tiende a no formar planicie a bajas frecuencias teniendo un comportamiento similar al de una suspensión polimérica no estructurada. En general, las suspensiones combinadas mostraron una disminución de su estructuración a 37 °C, sin embargo, las que se vieron menos afectadas fueron las que contenían 14 y 21 mg de BSA.



**Graf. 9. Curvas de cizallamiento oscilatorio de P1 y P2 a 14 y 21 mg/mL BSA.**

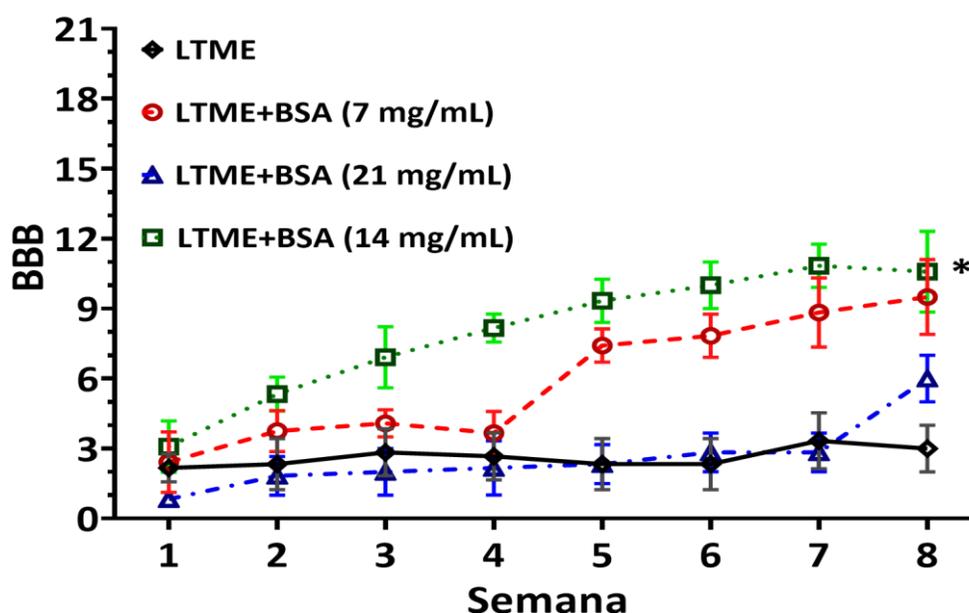
Estudio reológico en cizallamiento oscilatorio de suspensiones de PPPy/I con y sin BSA en soluciones. Los símbolos llenos corresponden al módulo elástico ( $G'$ , Pa) y los símbolos vacíos representan el módulo de pérdida ( $G''$ , Pa), todas las suspensiones contienen 10 mg por ml de P1 o P2. Las concentraciones de BSA corresponden a 0 ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ), 7 ( $\bullet$ ,  $\circ$ ), 14 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) y 21 ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) mg/mL, las temperaturas ensayadas fueron de  $T = 25^\circ\text{C}$  (A y B) y  $T = 37^\circ\text{C}$ . (C y D).

# 9. RESULTADOS: PRUEBAS *IN VIVO*.

### 9.1. Prueba de concentración de albúmina en LTME moderada.

En todos los casos se microinyectaron 10  $\mu\text{L}$  de PBS con la concentración de BSA correspondientes (Tabla 13). La Graf. 10 muestra el proceso de evolución en la recuperación funcional motora post LTME a lo largo de 8 semanas de acuerdo con los lineamientos establecidos en la escala BBB.

Al contrastar los cuatro grupos que recibieron BSA respecto al grupo lesión (LTME), fue posible determinar que la concentración de 14 mg/mL de BSA en PBS fue la única en presentar una respuesta funcional con diferencia significativa de acuerdo con el ANOVA de medidas repetidas seguida por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ , A.10.)



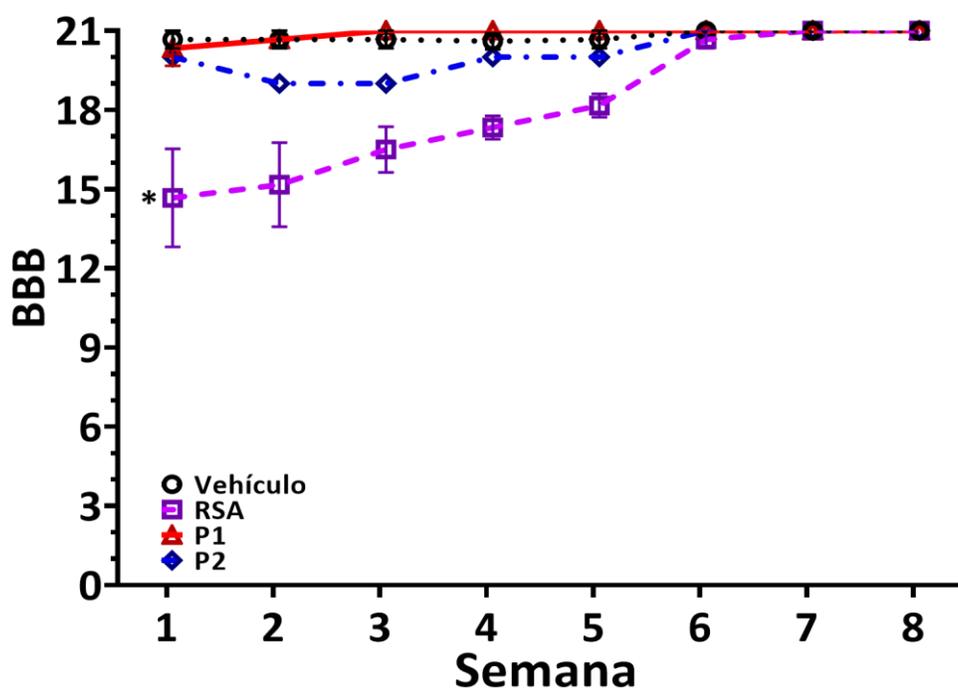
**Graf. 10. Tratamiento con diferentes concentraciones de BSA y recuperación funcional post LTME.**

Seguimiento de la recuperación funcional motora en extremidades posteriores a ocho semanas en ratas de la cepa Long - Evans con LTME y microinyectada con una solución de BSA a diferentes concentraciones. Los grupos constaron de una  $n = 3$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar. El valores con asterisco (\*) indica el grupo que presento diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

## 9.2. Suspensiones de PPPy/I con y sin RSA.

Graf. 11 muestra la evaluación de la función motora en animales sin LTME que recibieron 10  $\mu$ L de PBS como vehículo solo o ya fuese con albúmina de suero de rata (RSA), PPPy/I.1 (P1) o PPPy/I.2 (P2).

El análisis mediante ANOVA de medidas repetidas seguida por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ , A.11.) mostró un valor significativo para el grupo albúmina, en el cual vio afectación en la valoración de marcha normal de acuerdo a la escala BBB, con la recuperación de esta hacia el final del periodo de evaluación.

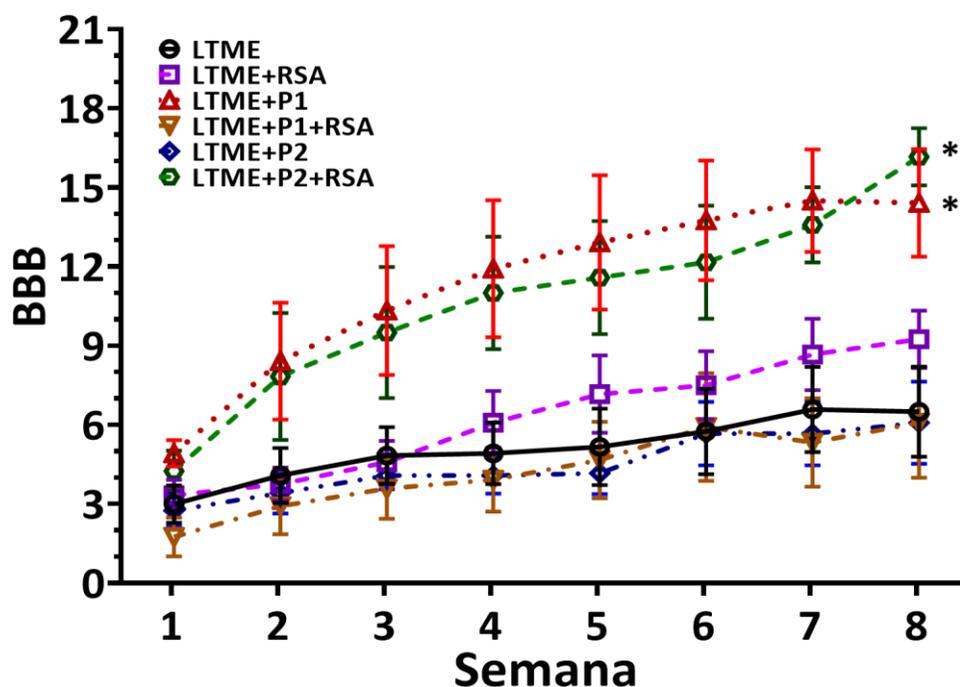


**Graf. 11. Evaluación de la funcional motora post tratamientos con P1, P2 o RSA sin LTME.**

Seguimiento de la función motora en extremidades posteriores por ocho semanas post microinyección de tratamiento. Los grupos constaron de una  $n = 6$ . Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar. El valor con asterisco (\*) indica el grupo que presentó diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Evaluación de la recuperación funcional motora en las extremidades posteriores en animales con LTME que recibieron tratamiento por microinyección de acuerdo con la Tabla 14.

Los grupos LTME + P1 y LTME + P2 +RSA, presentaron diferencia significativa una vez realizado el estudio de ANOVA de medidas repetidas seguida por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ , A.12.) al considerar al grupo LTME como control.



**Graf. 12. Recuperación funcional motora post tratamiento con PPPy/I y/o RSA.**

Seguimiento de la recuperación funcional motora en extremidades posteriores por ocho semanas post microinyección de tratamiento. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar. (LTME) Lesión, (RSA) Albúmina de suero de Rata, (P1 o P2) Polipirrol dopado con Yodo 1 o 2. Los valores con asterisco (\*) presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo LTME de acuerdo con el ANOVA de medidas repetidas seguida por la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

# **10. RESULTADOS: PRUEBAS *EX VIVO*.**

### 10.1. Resonancia magnética nuclear *ex vivo*.

Fig. 35 muestra imágenes representativas del estudio por RMN *post – mortem* de animales experimentales de los grupos lesión, lesión + PPPy/l.1 y lesión + PPPy/l.1 + RSA, previo a su procesamiento.

En los tres casos aquí mostrados se observan regiones oscuras de mayor intensidad denotando zonas de mayor extensión de daño (LTME) o tratamiento (LTME + P1 o LTME + P1 + RSA).

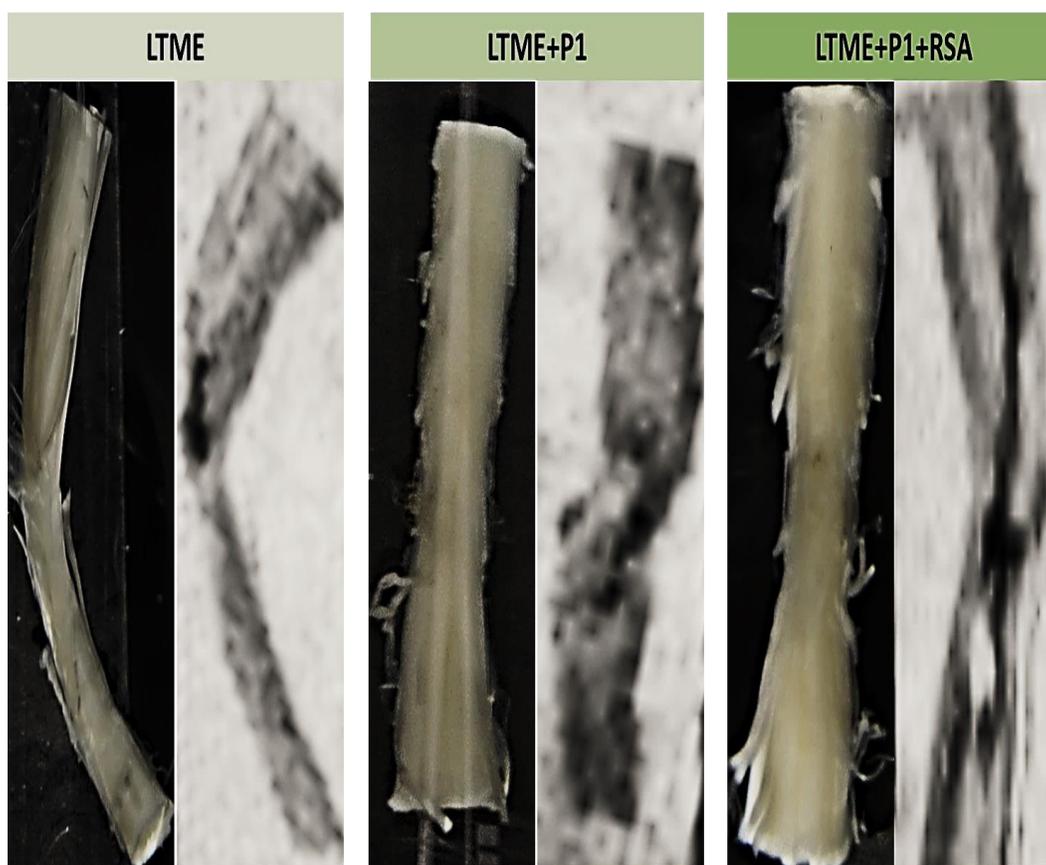


Fig. 35. Imágenes ópticas y por RMN *post mortem* de médulas espinal de animales experimentales.

## 10.2. Tinción de Lapham.

Fig. 36 muestra imágenes de secciones longitudinales de médulas recuperadas una vez concluidas las 8 semanas de seguimiento clínico, éstas son representativas de los grupos (A) Vehículo, (B) LTME, (C) LTME + P1 y (D) LTME + P1 + RSA. En donde puede observarse el grado de daño a partir del epicentro del sitio de lesión y el daño por siringomielia marcada con asterisco.

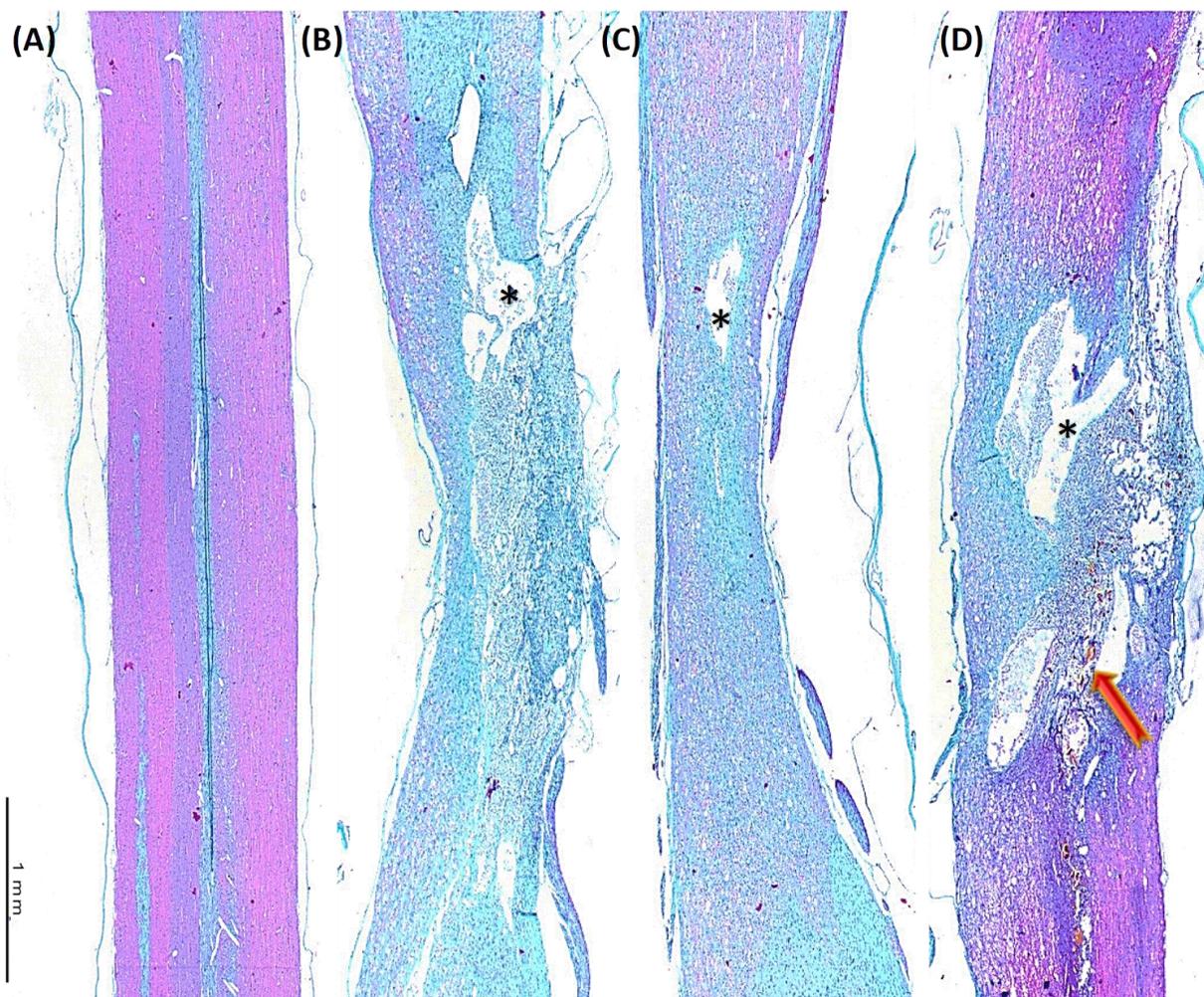
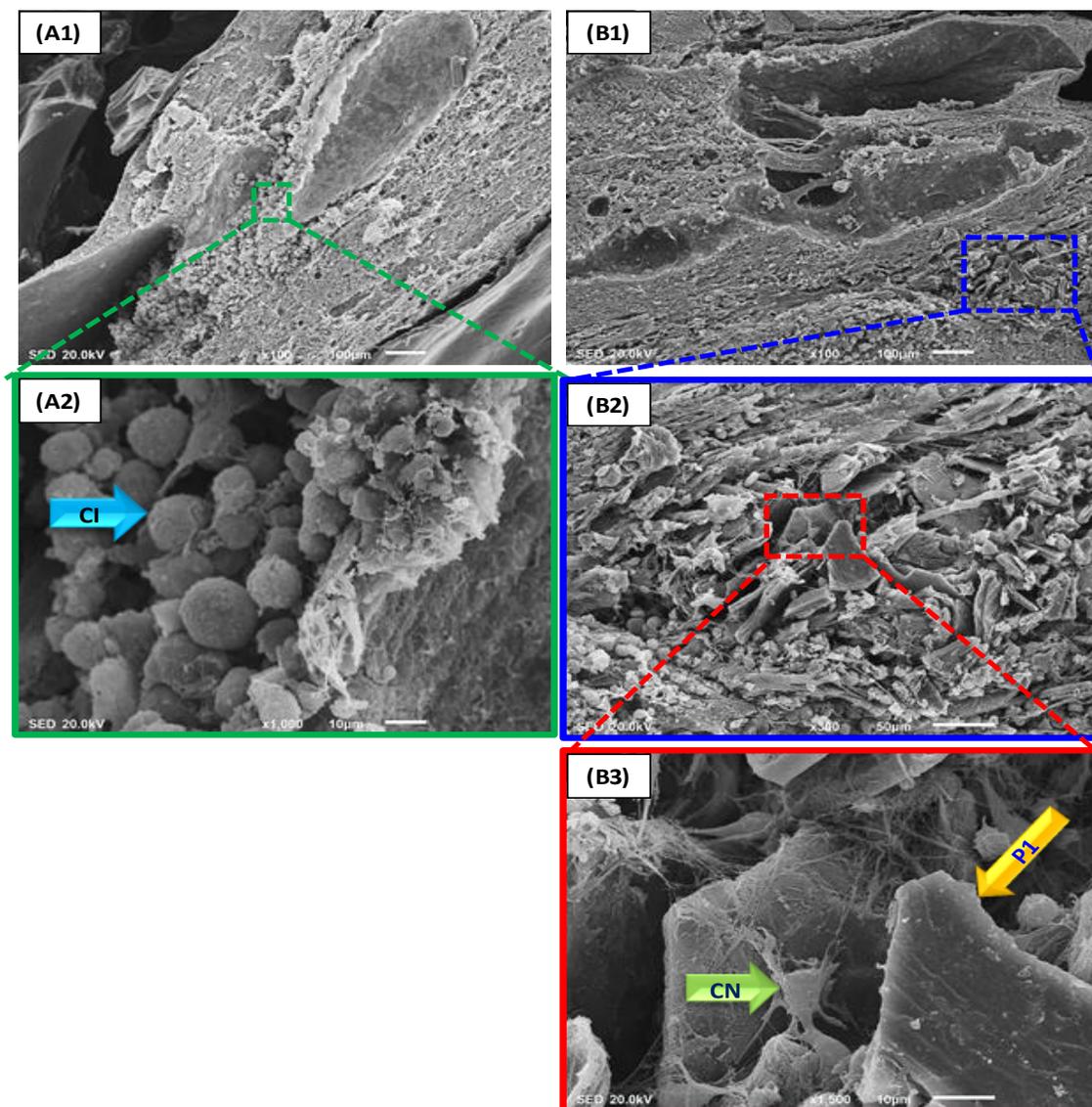


Fig. 36. Secciones de médula espinal con tinción de Lapham o método la Floxina - Verde rápido para mielina y las fibras gliales (2.5x).

### 10.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Fig. 37 muestra imágenes SEM representativas de cortes longitudinales de médulas con LTME y LTME más tratamiento con PPPy/I.1 (P1) en combinación con RSA.



**Fig. 37. Imágenes SEM de LTME con y sin implante de PPPy/I.**

En (a) se observa una médula con LTME del grupo vehículo, mientras que en (B) se observa una médula con LTME del grupo P1 + A. Una amplificación de ambas muestras permitió identificar lo que parecen ser células inflamatorias (CI) dentro del sitio de lesión. Por otro lado, es posible identificar un cumulo de PPPy/I.1 (P1) en interacción superficial con posibles células de tipo nervioso (CN).

# 11. DISCUSIÓN.

Los resultados de ambos polímeros de acuerdo con el espectro IR (Graf. 1) mostraron similitud en sus bandas, sin embargo, mostraron diferencias en las bandas ubicadas en  $1,275\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1,040$  y  $1,150\text{ cm}^{-1}$  que pueden asociarse con grupos C – O - C, que se presentaron como señales débiles. Uno de los principales grupos responsables de la diferencia, además del C – O - C, pueden ser los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), que se sitúan en las bandas de  $2,960$ ,  $2,850$ ,  $1,450$  y  $1,375\text{ cm}^{-1}$  en el espectro IR, pero estas líneas también pueden confundirse con otros grupos que no necesariamente se encuentran presentes en los materiales. Además, la posible existencia de aminas secundarias = N-H provenientes del pirrol, explicarían el aumento de la interacción hidrofóbica. La presencia de  $\text{CH}_3$ , así como la de aminas primarias (-  $\text{NH}_2$ ), implican que algunos grupos se hidrogenan posteriormente al rompimiento del anillo pirrólico, que es posible especialmente cuando se trabaja a baja potencia en la polimerización.

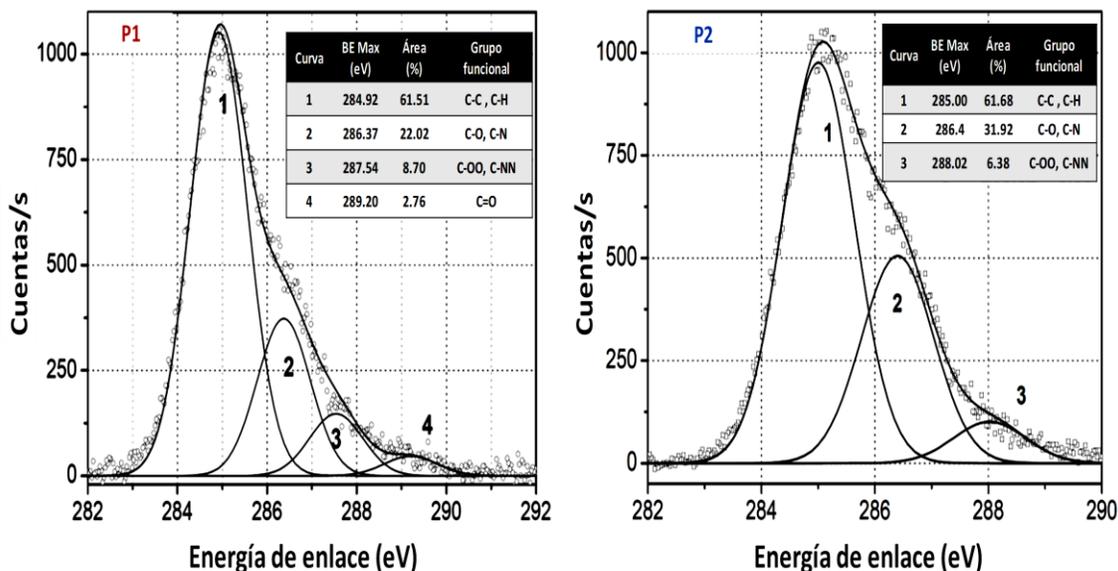
Los elementos C y N corresponden al monómero de pirrol (Fig. 34), cuya relación C/N = 4 se modifica durante el proceso de polimerización, obteniéndose una relación C/N final de 6.18 y 5.45 para P1 y P2, respectivamente. Esta modificación en la relación C/N proporciona evidencia de la ruptura del anillo pirrólico, lo cual permite que algunos fragmentos de bajo peso molecular escapen del reactor y con ello disminuyendo la presencia de átomos de N en el producto final. Mediante XPS también se detectó la presencia de átomos de Yodo, que pueden estar unidos covalentemente o atrapar en forma iónica como dopantes en la red polimérica formada.

La presencia de oxígeno dentro del análisis elemental de P1, indica que, al no ser parte de la molécula de pirrol, éste elemento provino probablemente de pequeñas fugas del vacío en el reactor, así como del ambiente una vez abierto el reactor, en cuyo caso el oxígeno se encargó de neutralizar radicales libres que permanecieran sobre la superficie del polímero formado. Sin embargo, para el caso de P2, dicho elemento también fue proporcionado por la corriente de agua requerida en la síntesis. La presencia del O en los materiales sintetizados repercute en el establecimiento de regiones o grupos oxidados, dichas regiones presentan su relevancia tanto en los análisis de ángulo de contacto como en las pruebas *in vivo* de las que se discutirá más adelante.

Es de notar que la relación O/N en ambos materiales difiere de forma tal que, para el caso de P1 la relación O/N = 1, esto sugiere la incorporación de un átomo de oxígeno por cada molécula de pirrol; sin embargo, en este material se detectó la presencia de silicio (Si, Graf. 2A) en una cantidad de 4.9 %, que puede deberse al desgaste del tubo de vidrio que conforma el reactor durante el proceso de síntesis o recuperación de P1 de las paredes de este. Por ello fue requerido ajustar los valores de O para P1, de aquí qué, asumiendo que el Si se encuentra presente como SiO<sub>2</sub>, entonces por cada 1% de Si presente en el material, se tiene una contribución adicional de 2% de O en P1, con lo cual es posible aseverar que 9.86% del O en P1 está relacionado con el Si detectado en el análisis, resultando en un 1.3 % de O presente en P1 (Tabla 15). Recalculando la relación O/N para P1, se obtuvo un valor de 0.11, lo cual sugiere la incorporación de un átomo de O por cada 10 moléculas de pirrol durante la síntesis de P1, en contraste con la relación O/N = 0.45 de P2 que establece que por cada 2 moléculas de pirrol se incorpora un O durante el proceso de síntesis de este material.

La deconvolución de los valores obtenidos por XPS respecto al pico dominante en cada polímero (Graf. 16) permitió estimar los grupos funcionales asociados con la química superficial respecto a la configuración electrónica C1s del Carbono. La formación de nuevos grupos funcionales ausentes en el monómero de pirrol se debe a la ruptura del anillo de pirrol dentro del entorno gaseoso ionizante establecido en el reactor durante el proceso de síntesis. Las funcionalidades que implican O en el caso de P1 podrían estar formadas por la presencia de oxígeno en el ambiente que probablemente se deben a fugas en el sellado del reactor, así como por la alta capacidad de respuesta de los radicales libres de la superficie que no cerraron antes de la ventilación del reactor. En el caso de P2, la entrada de la corriente de agua en el reactor ayudó a la formación de grupos con oxígeno además de las causas mencionadas anteriormente. Esto se puede ver en la deconvolución, ya que el pico con la energía de enlace de 286.4 eV toma un porcentaje más alto, indicando la presencia de enlaces C - O en la cadena principal. Ambas relaciones C/N y O/N mostraron que, a pesar de que ambos polímeros exhibieron prácticamente las mismas bandas de absorción para grupos funcionales similares en el IR, al realizar el análisis

por deconvolución (Graf. 16), algunos de los posibles grupos funcionales indicados por IR, expuestos por cada Pirrol, en realidad son diferentes.



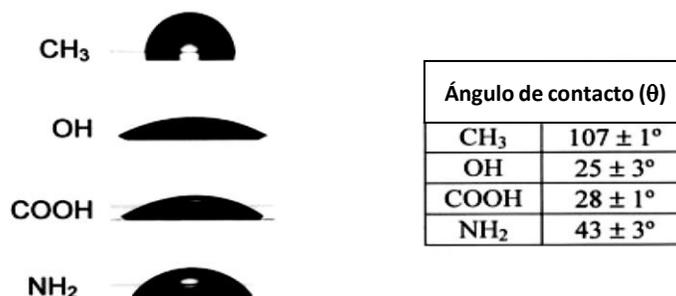
**Graf. 13. Análisis por deconvolución de los grupos funcionales asociados al carbono.**

La determinación del ángulo de contacto o humectabilidad es una herramienta que permite el estudio de la capacidad hidrofílica e hidrofóbica de un material en función de los grupos funcionales de la química superficial. Por lo tanto, tales pruebas desarrolladas en capa delgada son una medida que puede extrapolarse a partículas suspendidas del mismo material con la salvedad de que en el caso de partículas en suspensión estas exhiben un área superficial mayor en relación con la capa delgada.

Aunado a lo antes mencionado, es necesario considerar que las soluciones de BSA a las cuales fueron expuestas películas delgadas de P1 y P2 se realizó en PBS, el cual, es un medio con osmolaridad y concentración de iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  semejante a las que se presentan en el líquido extracelular de mamíferos (A.13.). Esto es de importancia debido a que dichos iones establecen el comportamiento electroquímico de los grupos funcionales superficiales tanto de P1 y P2 como el de BSA. En particular se sabe que un medio iónico como el del PBS a pH fisiológico (7.35 - 7.45)

propicia en BSA las interacciones intramoleculares que estabilizan su estructura tridimensional aunado al establecimiento de una densidad de carga negativa alrededor de la proteína debido a la polarización de los residuos aminoácidos expuestos al medio. Por lo tanto, la presencia de un medio iónico es relevante para el desempeño electroquímico en los procesos de adsorción de BSA en la superficie de cualquier material, tal y como lo sugieren los estudios de Zhang y cols. (27).

En este sentido, la Graf. 3, muestra un comportamiento similar al reportado tanto por Białopiotrowicz y Jańczuk como por A. Azioune y cols. (83, 84), en donde se puede contrastar la modificación superficial debido a la adsorción de albúmina. En los estudios mencionados, se reportó que conforme incrementa la concentración de albúmina, el comportamiento de la humectabilidad determinada por el ángulo de contacto se modifica generando tres regiones de interacción. Estas mismas regiones fueron observadas al exponer las películas de P1 y P2 a concentraciones crecientes de BSA (Graf. 3); cada región representa el cambio y dominio de grupos funcionales expuestos en la superficie (Fig. 38) (85). Dichos grupos proporcionan hidrofiliidad superficial por la presencia de grupos - NH<sub>2</sub>, - OH, - CO y - COOH e hidrofobicidad debido a grupos - CH<sub>3</sub>, anillos saturados y grupos alifáticos. Por lo tanto, en contraste con los resultados obtenidos por Keselowsky y cols. (85), así como Azioune y cols. (84), puede suponerse que la superficie de P1 podría estar dominada principalmente por - NH<sub>2</sub>, - COOH y - OH; mientras que en P2, se encontrarían grupos - CH<sub>3</sub>, - NH<sub>2</sub> y - COOH, pero predominan los efectos de los grupos - CH<sub>3</sub> que conferirían hidrofobicidad al comienzo de la prueba. Estos grupos son congruentes con los estimados por el análisis de deconvolución de los resultados de XPS.



**Fig. 38. Valores de referencia para ángulos de contacto característicos para grupos funcionales superficiales. Tomado de (85)**

Tomando en cuenta lo antes mencionado, la Graf. 3 fue dividida en tres regiones para su análisis (Tabla 16). La Fig. 36, muestra un esquema representativo de los posibles cambios superficiales debido al proceso de adsorción de albúmina sobre P1 y P2.

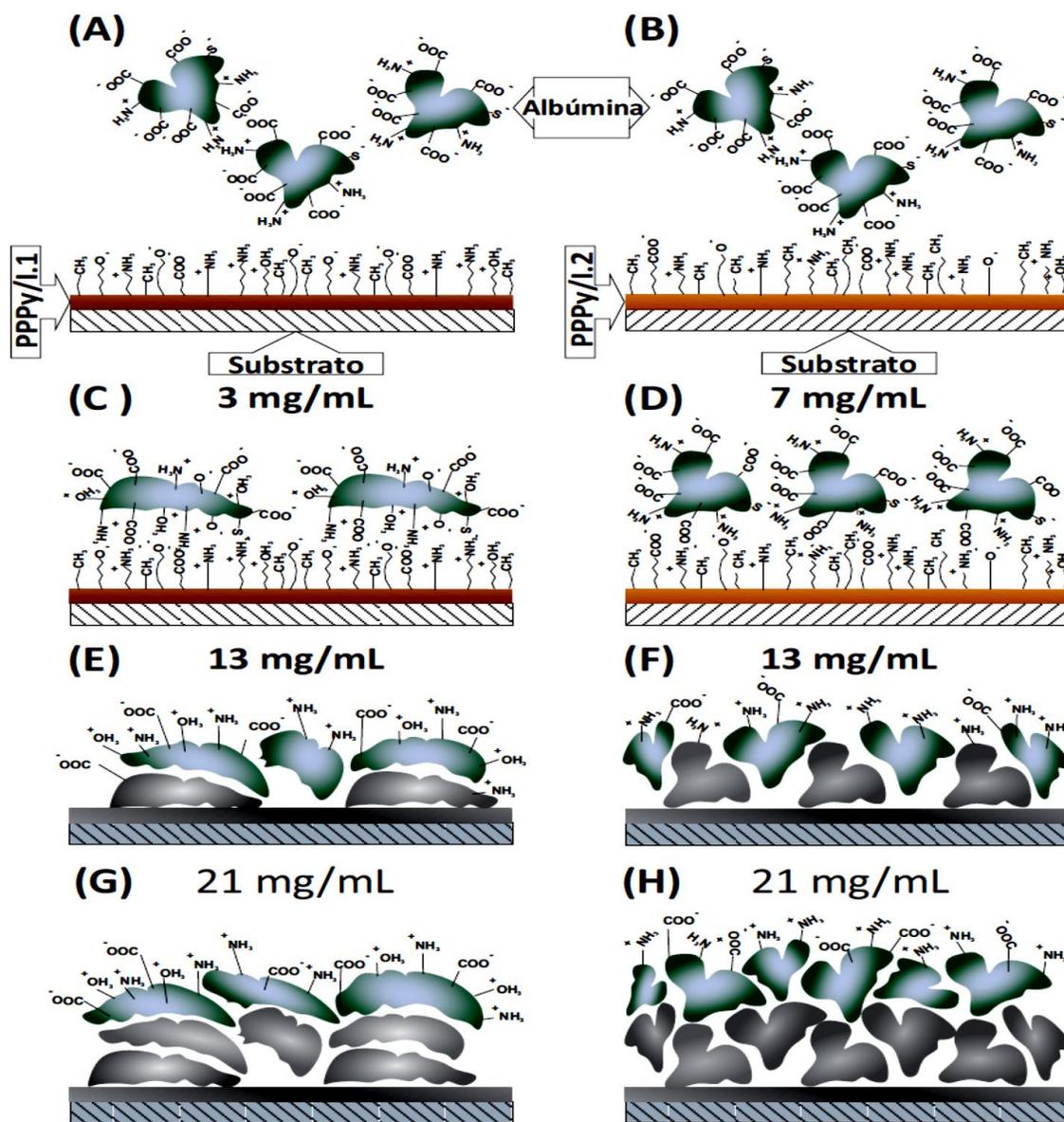


Fig. 39. Representación esquemática de la adsorción de BSA en la superficie de PPPy/I.

En el análisis de la región I se partió del supuesto que un ángulo de contacto superior a  $60^\circ$  corresponde a una superficie hidrofóbica, es posible asociar esta característica a P2, debido a que inicialmente mostró un ángulo de  $69.3^\circ \pm 2.9$ , el cual y de acuerdo a la literatura (85, 86) puede ser relacionado con la presencia de grupos alifáticos e insaturados mostrados tanto en el espectro IR (Graf. 1) como en los estados químicos para a la configuración electrónica C1s del Carbono; la presencia de estos grupos como resultado de la pérdida de C y N en conjunto con algunos H asociados a ellos durante el proceso de síntesis como lo establecen los datos de XPS (Tabla 15). Al considerar únicamente la contribución de las insaturaciones al comportamiento electrostático superficial de P2, es de imaginar que la superficie de este material presenta una densidad electrostáticamente negativa con algunas regiones positivas, siendo este el motivo por el cual se presenta un comportamiento predominantemente hidrofóbico.

Por otro lado, para el caso de P1, el valor inicial de ángulo de contacto correspondió a  $49.7^\circ \pm 5.3$ , dicho valor es similar al esperado para superficies ricas en grupos  $-NH_2$  (85), los cuales se relacionan con los grupos presentes en el espectro IR (Graf. 1) y los estados químicos para a la configuración electrónica N1s del Nitrógeno, por lo tanto, la presencia de estos grupos amino pudieran establecer una superficie predominantemente hidrofílica, es decir, con una carga electrostática superficial predominantemente positiva con algunas regiones negativas.

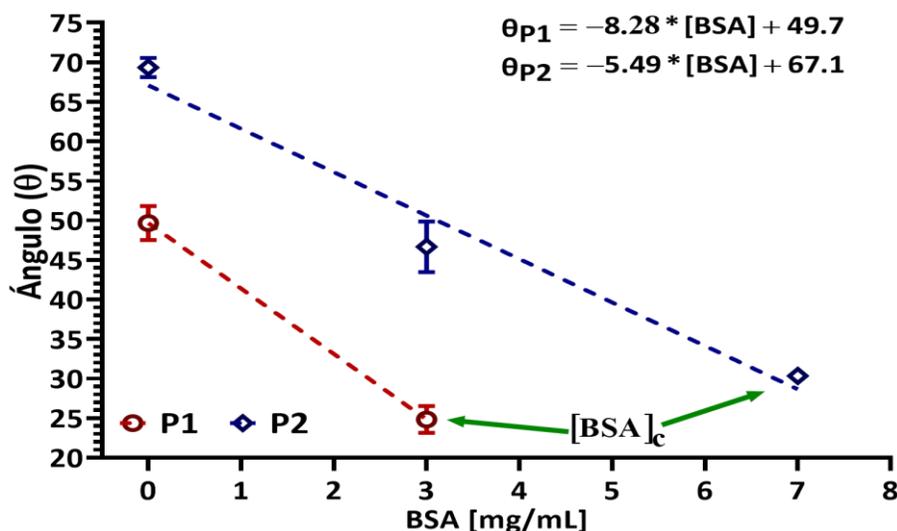
En ambos casos, conforme se incrementó la concentración de BSA la media del ángulo de contacto disminuyó hasta obtener un valor mínimo para cada polímero (Graf. 3), dicho valor denota la existencia de una concentración de BSA crítica ( $[BSA]_c$ ) en la cual, el proceso de adsorción de BSA llega a un límite máximo de interacción con el espacio superficial disponible por P1 y P2 (Tabla 17), es decir, se alcanza un punto en el cual se ha formado una monocapa de BSA en la superficie polimérica (Fig. 39 C y D). De esta forma, llegado a esta concentración crítica los grupos funcionales expuestos corresponderían a grupos  $-OH$  para P1, y  $-COOH$  para P2 (85), siendo estos grupos funcionales expuestos por el reacomodo conformacional de las moléculas de BSA adsorbidas.

De acuerdo al análisis de las pendientes obtenidas por regresión lineal, se establece que existe una diferencia estadística entre ambas pendientes ( $p < 0.05$ , A.7.), entendiendo estas como la tasa de cambio del ángulo de contacto respecto a la variación en la concentración de BSA ( $\frac{d\theta}{d[BSA]}$ ), dicha tasa muestra que debido a las características electrostáticas dependientes de los grupos funcionales superficiales y las condiciones iónicas establecidas por el PBS, el material P1 tiende a saturarse superficialmente con BSA a una tasa de 1.5 veces mayor en relación a P2.

Por lo tanto, el análisis para la región I (Tabla 17), apunta a que una vez alcanzada la  $[BSA]_c$ , el comportamiento de la química superficial de P1 y P2 se ve modificada hasta tener una predominancia hidrofílica debido a la presencia de grupos - OH y - COOH de los residuos de aminoácidos presentes en BSA los cuales quedan expuestos al formarse la nueva capa superficial.

Tabla 17. Valores críticos de la región I

	$[BSA]_c$	$\theta_m$	Grupos funcionales expuesto	$m = \frac{d\theta}{d[BSA]}$
P1	3	$24.8 \pm 4.2$	- OH, -COOH	$-8.28 \pm 0.9$
P2	7	$30.3 \pm 0.5$	- COOH, - NH <sub>2</sub>	$-5.49 \pm 0.4$



Graf. 14. Región I: Formación de monocapa de BSA sobre PPPy/I.

Región de adherencia de las zonas I de BSA en la superficie de P1 y P2, obteniendo la máxima interacción superficial en  $[BSA]_c$ . Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de seis mediciones realizadas. El análisis mediante el ajuste por regresión lineal (- -), indica que existe diferencia significativa entre las pendientes ( $p < 0.05$ ).

Una vez agotada el área superficial expuesta por cada polímero dada su  $[BSA]_c$ , el comportamiento de  $\theta$  presenta una tendencia de recuperación del valor observado hasta llegar a un ángulo máximo ( $\theta_M$ ) que corresponde a una concentración de BSA máxima adsorbida ( $[BSA]_M$ ) por superficie de ambos polímeros (Graf. 18); tal incremento en  $\theta$  es evidencia de la formación de un sistema multicapa de BSA que creció a partir de la monocapa formada previamente (Fig. 39 E y F), estas capas crecen hasta alcanzar un estado estacionario en donde las moléculas de BSA que se desprendan de las últimas capas serían substituidas por nuevas moléculas del medio circundante durante el proceso de exposición, previo al lavado con PBS para el caso de los ensayos en capa delgado, manteniendo este estado de recambio estacionario en los sistemas de partículas suspendidas.

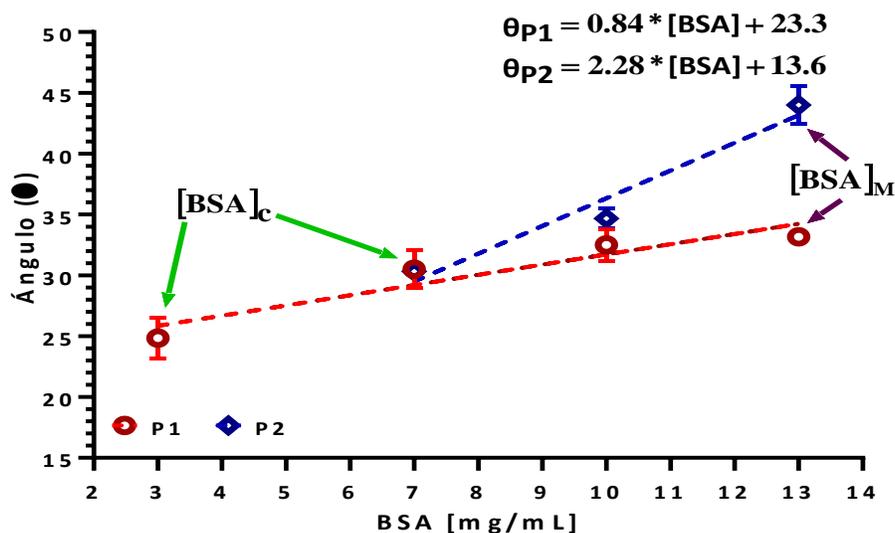
De acuerdo a la información disponible en la literatura (85, 87), una vez llegado a este punto de interacción, las últimas capas expuestas de BSA serían las responsables de exponer grupos funcionales tipo - NH, - OH y - COOH pertenecientes a los residuos polares libres que conforman el rearreglo conformacional de BSA, los cuales son altamente dependientes del pH fisiológico.

Luego entonces, al realizar los lavados para eliminar el excedente de BSA, en las pruebas realizadas en capa delgada, únicamente se estarían eliminando las moléculas que no alcanzaron a ingresar a la zona de multicapa más algunas otras moléculas que serían liberadas por un fenómeno de desorción química debida a la ausencia de BSA en el PBS de lavado. A pesar de ello, la concentración de  $[BSA]_M$  que permaneció remante en las multicapas, es suficiente como para mantener el de ángulo de contacto estable en la subsiguiente región III.

El análisis de las pendientes en la región II (Tabla 18), mostró diferencia respecto al valor de las pendientes obtenidas ( $p < 0.05$ , A.8.). De esta forma, la mayor tasa con la cual se obtiene el desarrollo de una monocapa hacia un sistema de múltiples capas de BSA al final de la región II, corresponde a la pendiente de P2, la cual, es 2.7 veces mayor a la obtenida para P1.

Tabla 18. Valores críticos de la región II

	$[BSA]_M$	$\theta_{m\acute{a}ximo}$	Grupos funcionales expuesto	$m = \frac{d\theta}{d[BSA]}$
P1	13	$33.2 \pm 1.2$	- COOH, - NH <sub>2</sub>	$0.84 \pm 0.18$
P2		$44.0 \pm 3.8$	- NH <sub>2</sub>	$2.28 \pm 0.26$



Graf. 15. Región II: Formación de multicapas de BSA sobre PPPy/I.

Región de adsorción de BSA en la superficie de P1y P2, obteniendo la máxima interacción posible entre PPPy/I – BSA – BSA ( $[BSA]_M$ ). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de seis mediciones realizadas. El análisis mediante el ajuste por regresión lineal, indica que existe diferencia significativa entre la pendiente de ambas rectas (- - -) ( $p < 0.05$ ).

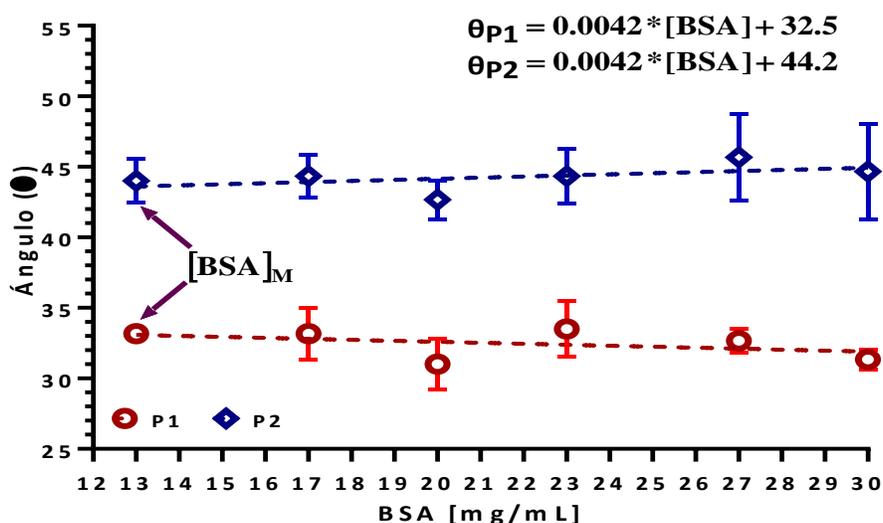
Finalmente, la región III, el ángulo de contacto se establece en un media para cada polímero (Tabla 19), dicho valor se conserva independiente al incremento de BSA a partir de  $[BSA]_M$  (Graf. 19). Una vez alcanzado este punto, se establece un sistema de múltiples capas de BSA el cual es limitado debido a los procesos de empaquetamiento e hidratación de este sistema, con el cual se establece el estado estacionario (27, 87, 88).

Al comparar los valores de las pendientes en la región III, pudo determinarse que no existen diferencias significativas entre ambas pendientes ( $p > 0.05$ ); sin embargo, sí existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ , A.9.) entre los valores promedio ( $\theta_p$ ) obtenidos para cada polímero (Tabla 19) de forma tal que es posible establecer que en la superficie de la multicapa

de BSA formada sobre P1 estarían predominando grupos funcionales – COOH y – NH<sub>2</sub>, mientras que en P2 la dominancia sería de grupos – NH<sub>2</sub>.

Tabla 19. Valores estacionarios de la región III

	$\theta_{\bar{P}}$	Grupos funcionales expuesto	$m = \frac{d\theta}{d[BSA]}$
P1	$32.5 \pm 1.24$	-OH, -COOH, -NH <sub>2</sub>	0.004 ± 0.053
P2	$44.2 \pm 1.24$	-NH <sub>2</sub>	

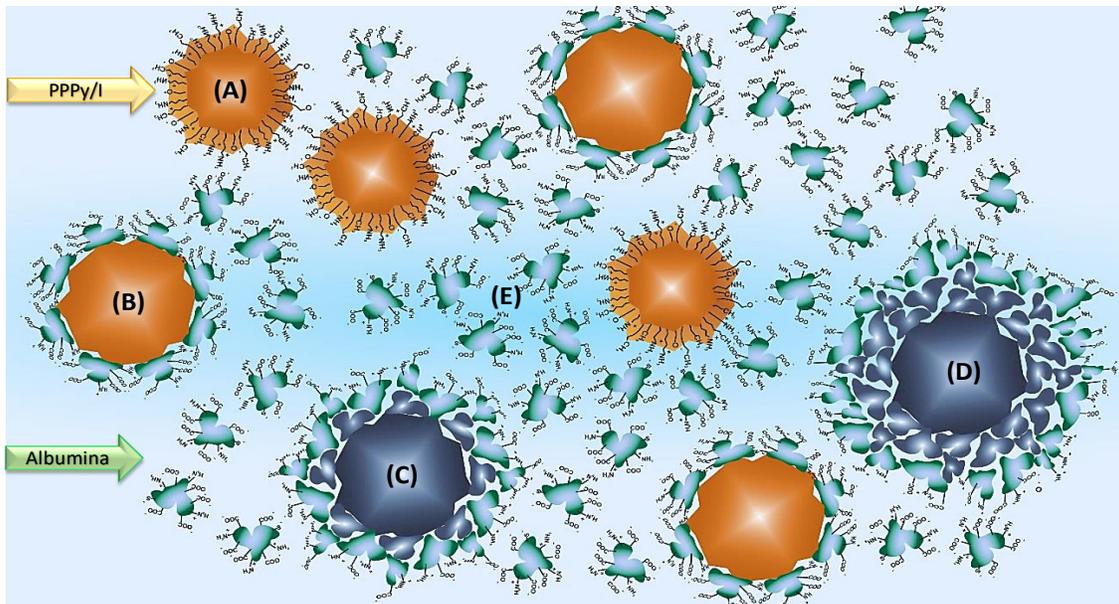


Graf. 16. Región III: Estado estacionario de multicapas de BSA sobre PPPy/I.

Región de sistema multicapas de BSA que se mantiene estable debido a un estado estacionario entre adsorción y desorción de BSA. Cada punto representa la media ± error estándar de seis mediciones realizadas. El análisis mediante el ajuste por regresión lineal (- - -), mostró que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas ( $p > 0.05$ ).

En términos reológicos, la proteína BSA presenta un comportamiento viscoelástico estable bajo condiciones de cizallamiento simple en el rango de temperatura de 25 a 37 °C (Graf. 4), ya que la desnaturalización de proteínas comienza alrededor de los 38 °C (89). Además, se ha documentado que las soluciones de BSA tienen un comportamiento estabilizado por fuertes interacciones moleculares entre proteínas globulares proximales, que implica no solo un comportamiento no newtoniano, sino también debido a procesos de adsorción y agregación existentes en la mayor parte de la solución, resultados en una limitación de fluencia, característica típica de un comportamiento reológico en sistema estructurado (90, 91),

característica identificada en pruebas de cizallamiento oscilatorio (Graf. 6) por presencia de una independencia a la frecuencia en  $G'$ , particularmente observadas en las concentraciones de 14 y 21 mg/mL a 37 °C en a las pruebas aquí realizadas. Este tipo de propiedades que han sido aprovechadas en el ámbito comercial para generar sistemas de acarreo y suministro de fármacos, o como en este caso fueron estudiadas para promover la estructuración de suspensiones particuladas de PPPy/I que fueron utilizadas como tratamiento de LTME mediante un proceso de microinyección, en el cual se involucran las componentes viscosas y esfuerzos de cizallamiento. La idea del como las partículas en suspensión en presencia de albúmina que pudieran estar interaccionando queda ilustrada en la Fig. 40, denotando que estos procesos de interacción entre PPPy/I - PPPy/I, PPPy/I – BSA y BSA - BSA son quienes definen la modificación del comportamiento reológico de las suspensiones ensayadas (92).



**Fig. 40. Representación de las interacciones presentes en las suspensiones de partículas PPPy/I en soluciones de BSA.**

Posibles interacciones presentes dentro de la fase continua que afectan el comportamiento reológico de la suspensión, propiciando una estructura interna dependiendo de las condiciones a las que está sujeta. (A) Interacciones entre partículas de PPPy/I "desnudas", (B) Partícula con monocapa de albúmina, (C y D) Partícula con sistema de multicapa, (E) Interacciones entre moléculas de albúmina y partículas cercanas poliméricas.

Para el estudio reológico en corte simple, se realizó un análisis de los datos utilizando el modelo propuesto por Cross (93). Este es uno de los modelos más básicos (Eq. 1) que permite estimar numéricamente la tendencia de la viscosidad a baja velocidad de cizallamiento ( $\eta_0$ ) manteniendo un valor de esfuerzo cortante constante. Este modelo proporciona una estimación de la región newtoniana y generalmente propone un comportamiento de viscoso en un amplio rango de velocidades de corte, con lo que es posible estimar numéricamente el comportamiento reo-adelgazante por cizallamiento en suspensiones cuando se someten a un esfuerzo que modifica la disposición de las partículas de PPPy/I y moléculas de BSA dentro de una suspensión (94).

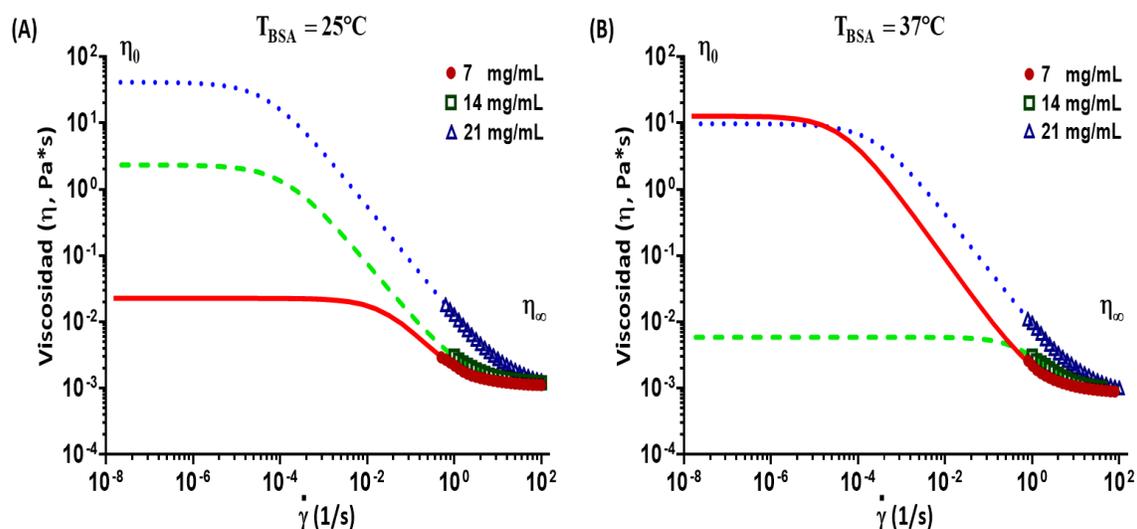
$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\lambda\dot{\gamma})^{\alpha}}$$

Eq. 1

Donde:  $\eta$  = viscosidad aparente  
 $\eta_0$  = viscosidad a bajos cortes  
 $\eta_{\infty}$  = viscosidad a altos cortes  
 $\lambda$  = constantes de tiempo  
 $\dot{\gamma}$  = velocidad de corte  
 $\alpha$  = exponente adimensional de la ley de potencias.

Al ajustar los datos reológicos de la Graf. 5 al modelo de Cross (Graf. 17) pudo observarse que todas las soluciones de BSA presentaron un comportamiento reo-adelgazante a altas frecuencias, sin importar la temperatura a la cual sea medida; indicando que, al aplicar una alta velocidad de cizallamiento durante el proceso de microinyección de cualquiera de estas concentraciones, la solución fluiría sin verse limitada por las fuerzas viscosas debido a las interacciones con las moléculas de BSA que estas ejercerían sobre las paredes a lo largo del canal de la aguja.

Por otro lado, éste mismo ajuste mostró que conforme disminuye la velocidad de cizallamiento, las soluciones cambian hacia un comportamiento reo-espesante, es decir, pierden fluidez e incrementan su valor de viscosidad debido a las interacciones con las moléculas de BSA.



**Graf. 17. Ajuste al modelo de Cross para soluciones de BSA bajo cizallamiento simple.**

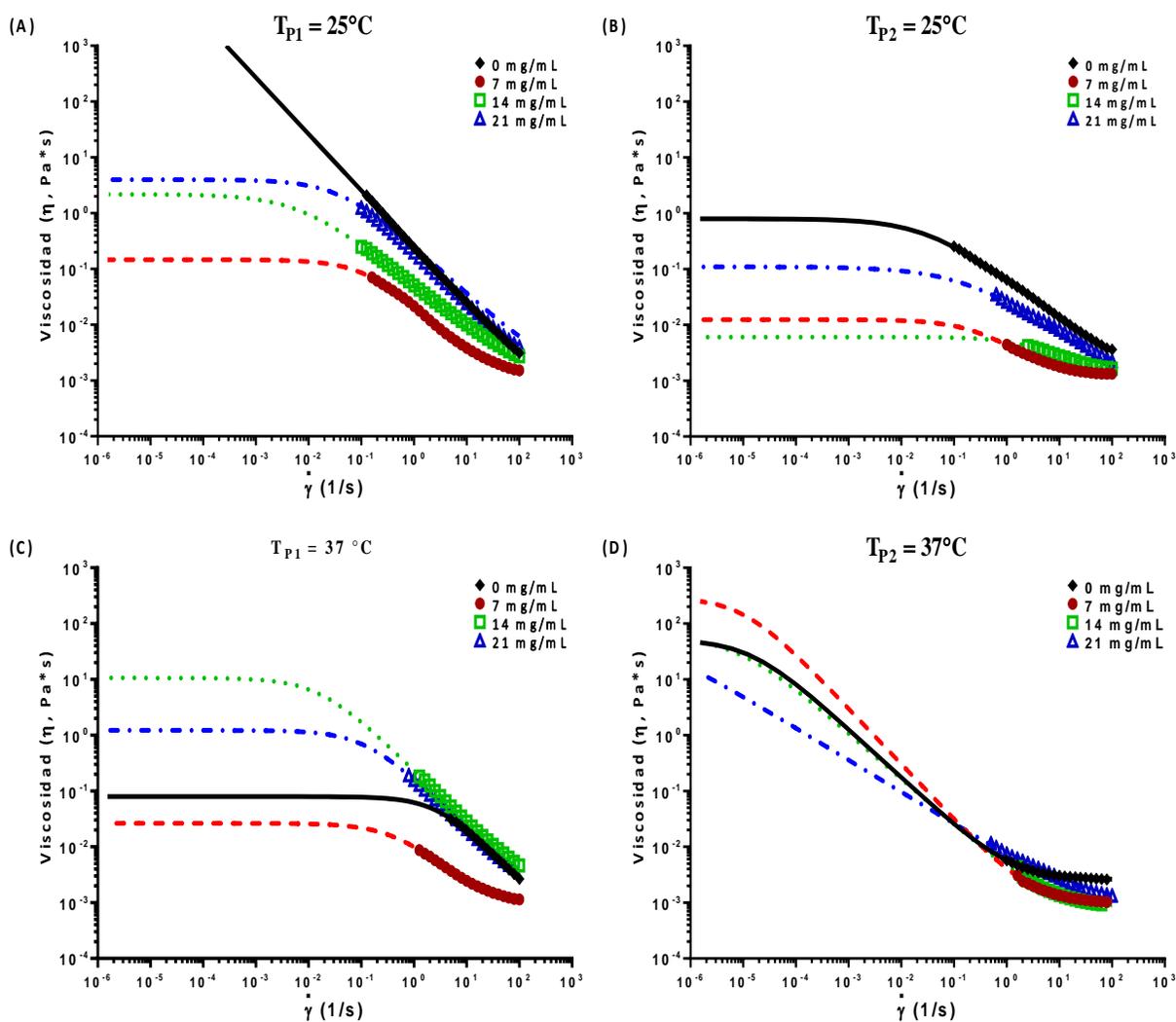
Curvas de flujo de los datos experimentales bajo cizallamiento simple de soluciones de BSA ajustados al modelo de Cross tanto a 25 °C (A) como a 37 °C (B). Donde,  $\eta_0$  y  $\eta_\infty$  representan la viscosidad a bajos y altos cortes de cizallamiento, respectivamente.

En la Tabla 20, pueden observarse los valores estimados mediante el modelo de Cross, en donde se aprecia que la solución de 7 mg/mL de BSA es la única que incrementa su valor de viscosidad a bajas velocidades de cizallamiento, mientras que las otras dos disminuyen este valor al incrementar su temperatura. Es probable que al incrementar tanto la concentración de BSA como la temperatura y al disminuir la velocidad de cizalla, estas moléculas tiendan a agregarse formando oligómeros que hidrodinámicamente son capaces de ofrecer una menor resistencia al fluido y con ello perdiendo considerablemente la viscosidad de la solución.

**Tabla 20. Valores de  $\eta_0$  y pendiente para BSA estimados con el modelo de Cross.**

[BSA] (mg/mL)	$\eta_0$ (Pa * s)		$\% \Delta_{\eta_0} = \left( \frac{\eta_{37} - \eta_{25}}{\eta_{25}} \right) * 100$	$m = \frac{d\eta}{d\dot{\gamma}}$		$\% \Delta_m = \left( \frac{\eta_{37} - \eta_{25}}{\eta_{25}} \right) * 100$
	25 °C	37 °C		25 °C	37 °C	
7	0.03	12.73	+ 42,333.00	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.01	+ 95.55
14	2.33	0.01	- 99.57	0.75 ± 0.01	0.43 ± 0.01	- 42.66
21	41.12	9.74	- 76.31	0.80 ± 0.01		--

Al contrastar los resultados de las pruebas de soluciones BSA con las de las suspensiones de PPPy/I con BSA, se puede observar el mismo comportamiento fenomenológico de reo - espesante a bajos cortes de cizallamiento (Graf. 18). Sin embargo, en las suspensiones de P1 y P2 en solución de 14 mg/mL de BSA se observó que en ambos hubo un incremento en el valor de su viscosidad (Tabla 21), comportamiento generalizado en las suspensiones de P2 y no así en las de P1.



**Graf. 18. Ajuste al modelo de Cross para suspensiones de PPPy/I a diferentes concentraciones de BSA en solución.**

Tabla 21. Valores de  $\eta_0$  y pendiente para suspensiones de PPPy/I en BSA estimados con el modelo de Cross.

[BSA] (mg/mL)	P1 (Pa*s)		$\% \Delta \eta_0 = \left( \frac{\eta_{37} - \eta_{25}}{\eta_{25}} \right) * 100$	P2 (Pa*s)		$\% \Delta \eta_0 = \left( \frac{\eta_{37} - \eta_{25}}{\eta_{25}} \right) * 100$
	25 °C	37 °C		25 °C	37 °C	
0	102,000.00	0.08	-100.00	0.80	45.70	5,641.21
7	0.15	0.03	-81.99	0.01	250.00	2,016,029.03
14	<b>2.16</b>	<b>10.60</b>	<b>390.74</b>	<b>0.01</b>	<b>46.40</b>	<b>768,111.92</b>
20	3.98	1.22	-69.35	0.11	12.90	11,734.86

El comportamiento del módulo elástico ( $G'$ , Fig. 8 y 9) muestra diferencias claras entre P1 y P2 al interactuar con BSA tanto a 25 como a 37 °C; asimismo, es posible apreciar los cambios en  $G'$  para la misma suspensión a ambas temperaturas. Al analizar la combinación de 10 mg de P1 + 21 mg de BSA/mL de PBS se evidencia una marcada independencia de  $G'$  respecto a la frecuencia en un rango comprendido entre 0.1 y 3 rad/s a temperatura de 25 °C (Fig. 9A), cosa que no sucede para las demás suspensiones que se encuentran hacia el final de la prueba casi un orden de magnitud por debajo; retomando la combinación de 21 mg de BSA su respuesta indica que bajo estas condiciones las interacciones P1 – P1, P1 – BSA y BSA- BSA propician un ordenamiento o estructuración interna que le permite a la suspensión comportarse tal como lo haría un sólido, dicho fenómeno es conocido como tipo sólido (solid - like) [34].

Este comportamiento de tipo sólido se ve abatido al incrementar la temperatura, llegando a comportarse como las demás suspensiones ensayadas a 37 °C (Fig. 8 y 9), lo cual da indicios de que a esta temperatura la energía absorbida por los componentes en la suspensión es tal que disminuye las interacciones antes mencionadas para con ello permitir a la suspensión refluidizarse, es decir, no solo se pierde el grado de estructuración interna, sino, que también se afecta el comportamiento viscoelástico de la suspensión como se puede apreciar en la Graf. 18B; por lo que es posible que se llegue a encontrar un rango de frecuencia mucho menor en el cual se obtenga nuevamente el comportamiento antes observado, pero a la temperatura de 37 °C.

En contraparte, el desempeño de P2 se mostró muy similar para todas las combinaciones probadas a 25 °C obteniéndose comportamientos tipo sólido en el rango de 0.1 a 3 rad/s (Graf. 8 y 9), es decir, exactamente el mismo rango que para una sola combinación de P1; este hecho exhibe que a pesar de haberse obtenido mejores resultados en cuanto a ángulo de contacto y viscosidad en cizalla simple para P1, la capacidad de obtener fluidos estructurados es mayor cuando se trabaja con P2 a 25 °C.

De igual modo, al someter las suspensiones de P2 a una temperatura de 37 °C, se aprecia que las combinaciones con 21 y 14 mg de BSA mantienen el comportamiento tipo sólido e incluso incrementan a tal grado que incrementan en una década anterior para  $G'$  a 25°C, es decir, el incremento de temperatura es capaz de ayudar a acentuar en el seno de la suspensión el arreglo estructural debido a las posibles interacciones antes mencionadas. En el caso de P2 el factor interno predominante para la generación de este fenómeno es indudablemente a la presencia de BSA, ya que, si se observa el comportamiento de la suspensión control, esta pierde toda posible estructuración comportándose como un líquido a 37°C en todo el rango de frecuencia probado (Graf. 8A).

Al conjuntar los resultados de las pruebas de flujo bajo cizallamiento simple y oscilatorio, se determinó que la combinación de 10 mg/mL de PPPy/I con 14 mg/mL de albúmina resultó ser la adecuada a ensayar en las pruebas *in vivo* por microinyección, ya que se espera que dentro del tejido con LTME se encuentre un sistema de bajos cortes de cizallamiento a corto y largo plazo, con lo cual, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se obtendría una mayor retención de polímero en la zona de influencia para con ello incrementar las posibilidades de recuperación funcional.

Desde el punto fisicoquímico, se estableció que el comportamiento superficial y de flujo de las suspensiones de partículas de P1 y P2 al interactuar con moléculas de albúmina depende en gran medida de los grupos funcionales expuestos al medio circundante. Es por ello, que el siguiente paso fue realizar pruebas biológicas que permitieran evaluar el efecto de la suspensión en los procesos de LTME, principalmente en la recuperación motora funcional. Para ello, una

primera aproximación fue la valoración de la concentración de albúmina requerida para los estudios *in vivo*.

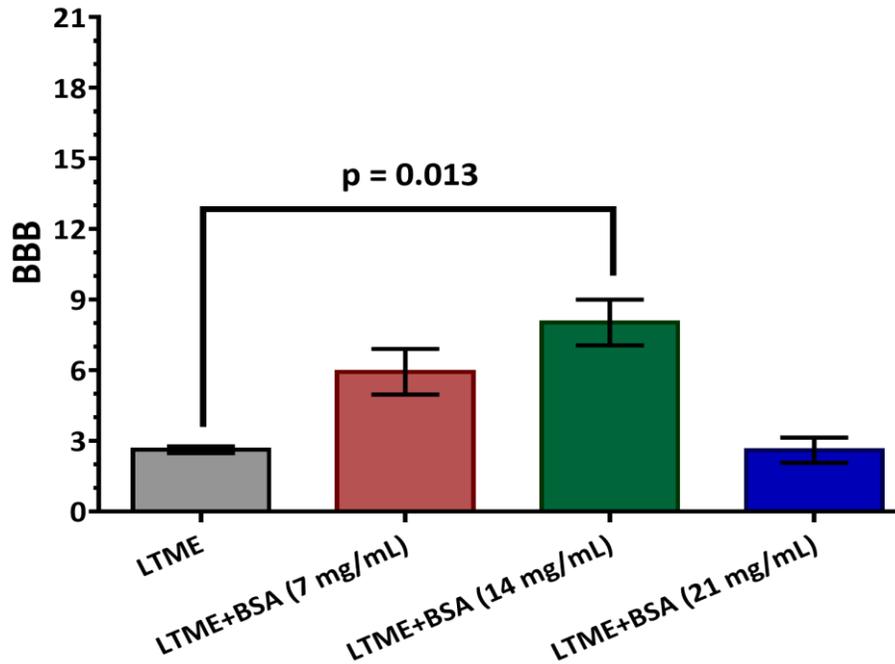
De acuerdo con los valores analizados por ANOVA de medias repetidas para las BBB obtenidos en ratas con LTME a las que se les suministraron diferentes concentraciones de albúmina (Graf. 18), se observó que 14 mg/mL fue la concentración a la cual se obtuvo una mayor recuperación funcional de acuerdo con un valor en BBB de  $10.6 \pm 1.7$  a las 8 semanas de evaluación, seguido por un  $9.5 \pm 1.6$  para la concentración de 7 mg/mL; cabe señalar que la escala BBB (A.3.) no es una escala lineal, por lo que, un cambio en un punto representa cambios significativos en la función motora.

Globalmente puede hablarse de un valor de BBB promedio para toda la evaluación, el cual fue de  $8.8 \pm 0.9$  para el tratamiento con 14 mg/mL de albúmina (Graf. 19), lo que significa que ante una LTME esté sería el valor mínimo esperado en cuanto a recuperación funcional ya que en contraste con una LTME sin tratamiento se obtendría una puntuación de  $2.5 \pm 0.1$ , entre ambos valores existe una significancia estadística ( $p = 0.013$ , A.10.) que en conjunto con los datos fisicoquímicos permitió establecer a 14 mg/mL como la concentración óptima para los ensayos *in vivo* aquí realizados.

Considerando lo antes mencionado, se procedió a evaluar la inocuidad del vehículo, RSA, P1 y P2 en animales sin LTME. Los puntajes de BBB analizados mediante el ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett, mostraron una diferencia significativa entre los grupos V y RSA ( $p = 0.002$ , A.11.). La misma prueba mostró que ni V, P1 o P2 generaron cambios significativos en la marcha de los animales de experimentación (Graf.11). Por lo tanto, se puede suponer que ninguno de ellos causó daño irreversible en el tejido de la médula espinal.

Desde el punto de vista clínico, cuando estos cuatro grupos fueron seguidos semanalmente, se observó que la marcha de los animales del grupo RSA se vio afectada, cayendo desde un valor de 21 esperado para un animal sano a un valor de  $15.0 \pm 1.0$  en la valoración de BBB en la primera semana de evaluación, al menos a una concentración de 14 mg/mL de albúmina. A pesar de ello, durante las semanas subsiguientes, este mismo grupo alcanzó valores

de marcha normal (BBB = 21), lo que indica que el organismo puede compensar la presencia de una sobrecarga de albúmina hasta restablecer las funciones normales a largo plazo.



**Graf. 19. Comparación global de la recuperación funcional post LTME con y sin tratamiento con BSA.**

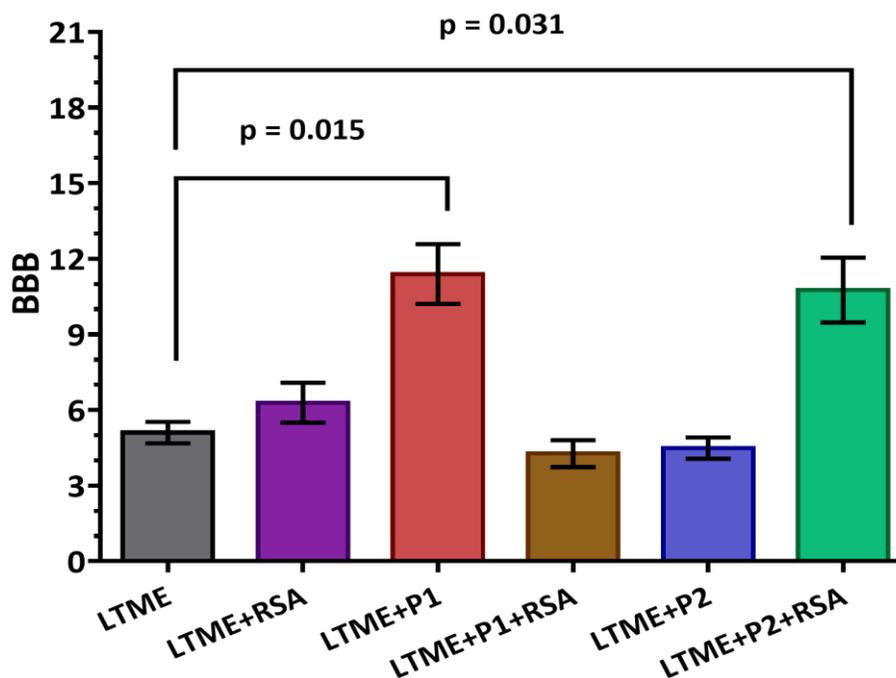
Seguimiento de la recuperación funcional motora en extremidades posteriores a ocho semanas una vez realizada una LTME y microinyectada una solución BSA. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar.

Con la certeza de que ninguno de los tratamientos sólo o combinados generaría un mayor daño al realizado por la propia LTME, y apoyado en la hipótesis de que no se induce la respuesta inmune debido a la presencia de polímeros derivados de pirrol, se observó en el seguimiento clínico que en animales con LTME los tratamientos con P1 y P2 + RSA permitieron un puntaje máximo de recuperación en las 8 semanas posteriores a su administración en el sitio de lesión, obteniendo valores de  $14.4 \pm 2.0$  y  $16.2 \pm 1.1$ , respectivamente (Graf. 12).

Los grupos previamente mencionados, mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo LTME sin tratamiento, manteniendo un media de  $12.4 \pm 1.2$  para el grupo P1 y de  $11.3 \pm 1.3$  para el grupo P2 + RSA ( $p = 0.015$  y  $p = 0.031$ , respectivamente). Sin embargo, como se aprecia en la Graf. 20, el comportamiento de ambas suspensiones fue muy similar desde el punto de vista clínico y de acuerdo con el análisis estadístico, no se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos LTME + P1 y LTME + P2 + RSA ( $p > 0.05$ ).

Tal comportamiento puede interpretarse de acuerdo con los datos del ángulo de contacto previamente analizados. Dichos datos sugieren que la superficie de P1 estaría dominada por grupos - NH<sub>2</sub>, mientras que P2 requiere la formación del sistema de albúmina multicapa para presentar el enriquecimiento superficial por grupos - NH<sub>2</sub>. Aún más, se debe considerar que los procesos de interacción P2 - albúmina serían tan estrechos que ayudarían incrementar la organización interna de la suspensión (Fig. 40) al aumentar la capacidad de interactuar con el tejido dañado una vez que la combinación P2 + RSA ingresa al sitio de la lesión, es decir, los grupos funcionales expuestos por la albúmina en la multicapa formada sobre el material, proporcionando las características apropiadas para tener un papel biológico favorable en la recuperación funcional después de una LTME, como lo hace P1.

Mientras que para P2 y la combinación de P1 + RSA, en esta última donde se intercambia la química de la superficie, es decir, P1 + RSA expondría los grupos - COOH y - OH, así como posiblemente algunos grupos - CH<sub>3</sub> y - NH<sub>2</sub> de la albúmina en el sistema de múltiples capas, dichos grupos funcionales son característicos de P2 en su superficie, como lo sugieren los estudios de ángulo de contacto y XPS. Estos cambios en la química de la superficie fueron relevantes ya que, como se muestra en la Graf. 11, los valores de BBB no fueron positivos para la recuperación funcional después de un LTME. De forma tal que en promedio los valores de BBB para los tratamientos P1 + RSA y P2 fueron de  $4.3 \pm 0.5$  y  $4.1 \pm 0.4$  respectivamente, los cuales, quedaron incluso por debajo de la media obtenido para el grupo LTME con un puntaje en BBB de  $5.1 \pm 0.4$  (Graf. 20).



Graf. 20. Comparativo de la media de los grupos LTME con tratamiento.

Con lo hasta aquí mencionada queda constatado que la química superficial juega un papel importante en cuanto al desempeño fisicoquímico de los polímeros derivados de pirrol obtenidos por este método de síntesis, y que es de gran importancia el tipo de grupos funcionales expuestos a un entorno biológico a tal grado que se puede tener una recuperación o afectar la funcional motora tras una LTME.

Como parte de unos estudios adicionales que ayudasen a corroborar lo que los estudios reológicos establecieron en cuanto al comportamiento de la suspensión a bajos corte de cizallamiento, se realizaron estudios de RMN *ex vivo* de animales pertenecientes a los grupos lesión y tratamientos con P1 (Fig. 35).

De los datos obtenidos por la secuencia realizada a las muestras de médula espinal se realizó una reconstrucción tridimensional (Fig. 41) en la que el color morado corresponde a tejido nervioso que incluye tanto sustancia gris como sustancia blanca sin hacer una diferenciación entre una y otra, como se muestra en la Fig. 41A que es una reconstrucción volumétrica de una

médula sin LTME; mientras que las zonas de amarillo a rojizo corresponden a las que incluyen zona de quistes (Fig. 41B), zonas con quistes y presencia de P1 (Fig. 41C) o de P1 + RSA (Fig. 41D). Como puede observarse, debido a que el PPPy/I no genera una señal propia que sea fácil de resolver en el análisis imagenológico, el seguimiento de la presencia de este en el tejido es complicado; sin embargo, es posible observar zonas en las que probablemente se encuentre agrupado en mayor concentración. Al mismo tiempo, RMN nos permitió observar que la zona de quiste y por tanto el avance de la degeneración del tejido por siringomielia es inferior en relación con una médula que no recibió ningún tratamiento.

Esta afirmación se corrobora mediante los cortes histológicos presentes en la Fig. 36, en el que la tinción de Lapham tiñe de color magenta tejido mielinizado correspondiente, principalmente, a sustancia blanca y de tonos azul – verdosa la sustancia gris. Esta técnica de tinción representa ventajas respecto a Luxol – Fast Blue y Hematoxilina -Eosina, ya que permite discernir claramente entre ambas sustancias en tejido nervioso debido al contraste entre el magenta y el azul – verdoso.; e incluso cuando existe la presencia de tejido cicatricial, éste tiñe de morado.

En la Fig. 36D puede apreciarse como se encuentra distribuido el material a lo largo de la zona lesionada e incluso que se encuentra en una mayor cantidad respecto al tratamiento con P1 sin albúmina (Fig. 36C), que empata con la distribución presentada por RMN en la Fig. 41.

Además, al realizar una ampliación de las muestras observadas mediante SEM (Fig. 42), puede observarse la presencia de estructuras ausentes en médulas con LTME sin tratamiento. Por ejemplo, en la Fig. 42B existen estructuras tubulares que asemejan posibles neo – vascularizaciones a las cuales se encuentran adosadas posibles células nerviosas del tipo astrocitario, estas últimas se observaron abundantemente en otras zonas dentro de lo que sería la pared del quiste formado posterior a la LTME. A este punto no es posible establecer con claridad a que tipo específico de células corresponden las estructuras observadas, sin embargo, lo que queda claro es que la presencia del PPPy/I (círculo amarillo) tiene influencia en los

procesos neuro protectores y posiblemente en los neurorregenerativos presentes en el tejido dañado.

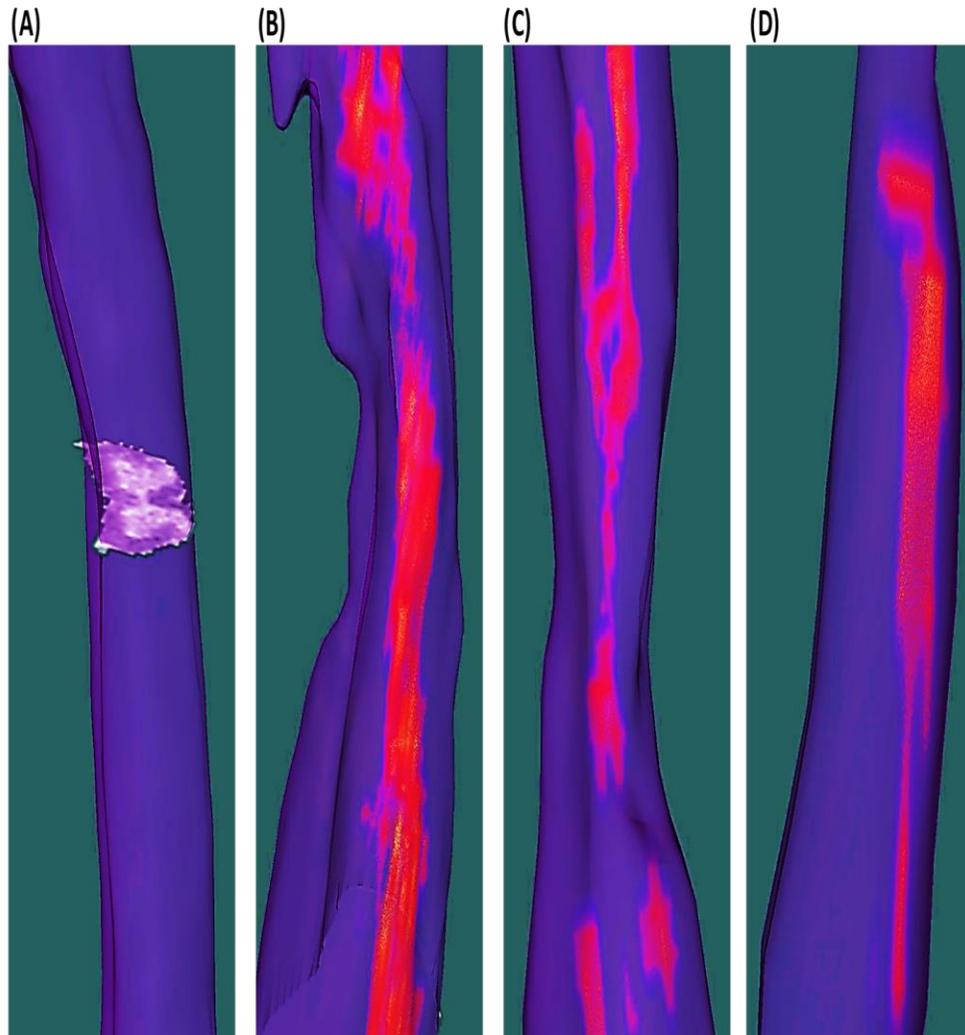
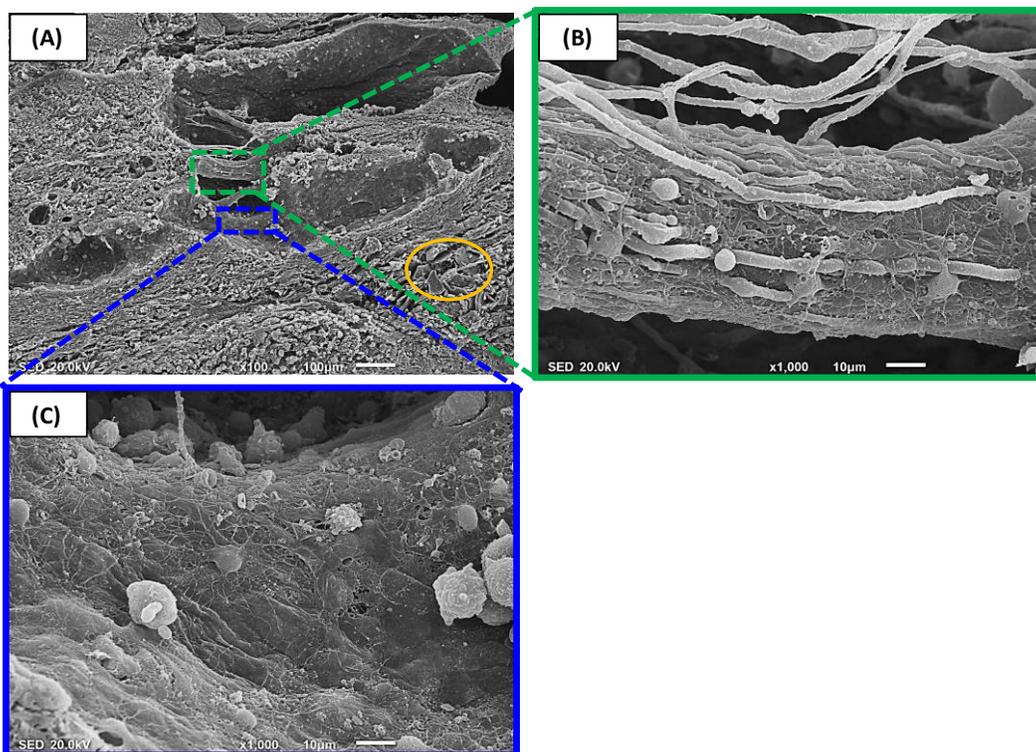


Fig. 41. Reconstrucción de imágenes de RMN de médulas *ex vivo*, correspondiente a la extensión del daño en forma volumétrica a lo largo de la médula espinal

En suma, con los resultados obtenidos en recuperación funcional de acuerdo con la escala BBB, las reconstrucciones por RMN e imágenes histológicas, estas observaciones en las imágenes SEM pudieran asociarse con procesos no únicamente de neuroprotección sino también a procesos de neuroregeneración en tejido que haya sufrido una LTME.



**Fig. 42. Amplificación de imágenes obtenidas por SEM de médula espinal del grupo LTME + P1 + RSA.**

# **12. CONCLUSIONES.**

Las pruebas *in vivo* en animales no lesionados establecieron que cuando el vehículo, PPPy/I.1 (P1) o PPPy/I.2 (P2) se administran en tejido nervioso sano, sus funciones de marcha no se ven afectada a corto o mediano plazo. Por lo tanto, podemos concluir que la administración de polímeros de Polipirrol dopados con Yodo sintetizados vía energía de plasma, no representan un riesgo para el desempeño de las funciones motoras en el tejido sano.

En el caso de animales intactos tratados con albúmina, sus funciones motoras tales como la rotación de la pata durante la marcha se vieron afectadas a corto plazo, con una recuperación completa a mediano plazo.

Fue posible determinar la concentración de proteína crítica requerida para formar una monocapa de proteína en la superficie de ambos polímeros. Asimismo, obtuvieron datos que permitieron pensar en la formación de un sistema de proteínas multicapa estable en la superficie de los biomateriales.

El análisis de XPS y ángulo de contacto permitieron establecer la diferencia superficial entre los dos polímeros (P1 y P2) que da origen a las diferencias de comportamiento en los experimentos *in vivo*.

La prueba de ángulo de contacto permitió también proponer un modelo de cobertura de la proteína en la superficie que resulta congruente con los resultados *in vivo*.

El sistema multicapa propicio cambios drásticos en el comportamiento de P1 y P2, repercusiones considerables en los ensayos *in vivo*, ya que en ambos polímeros cambió considerablemente la puntuación BBB al interactuar con la proteína, de forma tal que LTME + P2 + RSA obtuvo el mayor puntaje de  $16.2 \pm 1.1$ , y se redujo fuertemente sin la proteína hasta un valor de  $6.1 \pm 1.6$ ; en el caso de LTME + P1, el puntaje BBB sin albúmina fue de  $14.4 \pm 2.0$ , mientras que para LTME + P1 + RSA fue de  $6.1 \pm 2.1$  hacia el final del seguimiento clínico.

Los datos reológicos de las suspensiones de partículas de ambos PPPy/I en régimen de cizallamiento oscilatorio, evidenciaron la capacidad de la interacción de P1 y P2 con la proteína

albúmina, obteniendo un comportamiento tipo sólido a bajas frecuencias a temperatura cercana a la corporal; esta fenomenología es de interés para la microinyección como tratamiento para LTME, con el objetivo de que las partículas PPPy/I permanezcan en el sitio de la lesión por más tiempo. Sin embargo, los resultados de las pruebas *in vivo* mostraron que la interacción superficial de la proteína tomó el papel principal en la recuperación motora de los animales experimentales.

Las micrografías SEM muestran que cerca de las zonas con quistes en los animales control hay presencia de células inflamatorias en contraste con los animales del grupo LTME + P1 + RSA, los cuales mostraron posibles células nerviosas y una menor cantidad de células inflamatorias.

La histología del animal control muestra destrucción tisular y quistes abundantes. En el LTME + P1 + RSA existe una menor cantidad de quistes y el tejido muestra rastros de color magenta que denotan la presencia de mielina.

Las imágenes por RMN permitieron identificar las zonas en las que se extendió el daño posteriormente a la LTME, sin embargo, no fue posible discernir entre la zona formada únicamente por quistes y aquellas en las que estuviera aglomerado el polímero; a pesar de ellos, fue posible observar que el tratamiento combinado generó zonas con una menor extensión de daño en relación con las que no recibieron tratamiento.

# **13. PERSPECTIVAS.**

1. Establecer el tamaño promedio de partícula y su interacción con el tejido es de suma importancia para establecer una dosis para tratamiento estándar.
2. Los efectos de neuroprotección de la albúmina y del P1 fueron observados al trabajar individualmente, por lo que su aplicación en diferente sección de la lesión es una opción para ser considerada.
3. Es importante considerar algún otro vehículo que no interaccione con la química superficial de PPPy/I.1 para mantener su capacidad neuroprotectora.
4. Son requeridas técnicas inmunohistológicas que permitan diferenciar con certeza el tipo de células que interacción con el material PPPy/I.
5. Se requiere afinar el trabajo en RMN que permita identificar claramente el sitio en el que se encuentra depositado/agregado el material posterior a la microinyección de cualquier suspensión de PPPy/I en el sitio de lesión.
6. La evaluación de dosis/respuesta al incrementar la concentración de PPPy/I es requerida para futuros protocolos.

# **14. PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN.**



## Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats

Omar Fabela-Sánchez<sup>1,2</sup> · Hermelinda Salgado-Ceballos<sup>2,3</sup> · Luis Medina-Torres<sup>4</sup> · Laura Álvarez-Mejía<sup>1,2</sup> · Stephany Sánchez-Torres<sup>2,3,5</sup> · Rodrigo Mondragón-Lozano<sup>2,3,6</sup> · Axayácatl Morales-Guadarrama<sup>1,7</sup> · Araceli Díaz-Ruiz<sup>8</sup> · María-Guadalupe Olayo<sup>9</sup> · Guillermo J. Cruz<sup>9</sup> · Juan Morales<sup>10</sup> · Camilo Ríos<sup>8</sup> · Roberto Olayo<sup>10</sup>

Received: 26 September 2017 / Accepted: 5 December 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

**Abstract** Traumatic spinal cord injury (TSCI) is a health problem for which there is currently no treatment or definitive therapy. Medicine has explored therapeutic options

for patients with TSCI with the aim to improve their quality of life. One alternative has been the development of biomaterials that offer neuroprotection or neuroregeneration of damaged nerve tissue. The microinjection of iodine-doped polypyrrole particles synthesised by plasma (PPPy/I) has shown neuroprotective effects that favour motor function recovery in experimental animals with TSCI. However, their ability to migrate into the tissue has led to the need to test a suspension vehicle that enables the concentration of particles at the site of injury. To achieve this, two biomaterials of PPPy/I (P1 and P2) were studied. The superficial physicochemical characterisation of the polymers was performed by infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle. The rheological performance under oscillatory shear rate of suspensions containing both polymers alone and in combination with bovine serum albumin was also studied. *In vivo* tests were performed on animals with and without TSCI that were microinjected with particles of P1 or P2 in suspension using a solution of rat serum albumin. Exposure to the protein solutions generates a protein multilayer on the surface of the biomaterials that can drastically change the behaviour of both P1 and P2, which led to severe repercussions in the *in vivo* assays. The results showed that surface chemistry plays an important role in the performance and that it is possible to treat TSCI with these materials.

✉ Roberto Olayo  
oagr@xanum.uam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación del Proyecto CAMINA A.C., 14050 Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>5</sup> División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, Mexico

<sup>6</sup> Catedrático CONACYT- Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

<sup>7</sup> Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica, Universidad Autónoma Metropolitana, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, Vicentina, 09340 Ciudad de México, Mexico

<sup>8</sup> Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez S.S.A., 14269 Ciudad de México, Mexico

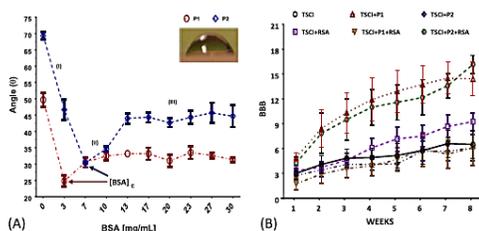
<sup>9</sup> Departamento de Física, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 52750 Estado de México, Mexico

<sup>10</sup> Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, Mexico

Published online: 28 December 2017

Springer

evidenced by the establishment of a plateau in the determination of the contact angle. *In vivo* tests showed that this interaction may be beneficial in the treatment of traumatic spinal cord injury (TSCI), depending on the surface characteristics with or without rat serum albumin (RSA). The TSCI+P1 and TSCI+P2+RSA groups obtained significant differences in functional recovery compared with the control group according to the Basso, Beattie and Bresnahan scale (BBB).



## 1 Introduction

In recent decades, medicine, as well as the areas of knowledge that comprise it, has developed great technical and scientific advances, whereby it is now possible to restore or improve the functions of organs and tissues damaged by disease or trauma. Materials science has an important impact in this area by developing materials capable of interacting with living systems at different levels of complexity, ranging from cellular interactions to full living organs. Nevertheless, one of the major problems addressed through the use of biomaterials has been the treatment of traumatic spinal cord injury (TSCI). The incidence of TSCI in 2016 in the USA was only estimated at approximately 54 new cases per million inhabitants [1]. To recover the motor ability of patients, various strategies using biomaterials have been designed that consider two main aspects of TSCI pathophysiology: the neuroprotection of surviving tissue after primary or mechanical damage and the neuroregeneration of nerve tissue that could not be protected from damage. Polypyrrole polymers synthesised by plasma and doped with iodine (PPPy/I) [2] produced favourable results in *in vitro* cultures by acting as a scaffold for the growth of nerve cells [3, 4]. Moreover, in experimental models of TSCI *in vivo*, PPPy/I has been used as a compressed powder implant [5, 6] or as a suspension of particles microinjected into the injured spinal cord site [7], and it improved motor function recovery. Nevertheless, histological tests performed by Álvarez-Mejía and collaborators [7] showed that

a microinjection of particles of PPPy/I favours a dispersion of the biomaterial beyond the site of injury. A possible solution for this phenomenon may be to take advantage of the physicochemical characteristics of the PPPy/I surface. This may allow it to interact with various proteins and obtain a delivery vehicle that, under certain conditions, behaves as a system of high viscosity at low shear flow, thereby reducing the dispersion of material.

Under this consideration, the protein serum albumin is a biomolecule of great interest because its biological characteristics are involved in the transport of nutrients and drugs, the regulation of pH and physiological osmotic pressure, chelating properties [8–10] and neuroprotective capacity against neurotoxicants, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and high concentrations of calcium ( $Ca^{2+}$ ), among other characteristics [11, 12]. Some of these properties have been exploited by various industrial sectors with commercial uses to obtain structured fluids or semisolid systems with multiphase structures [13]. Therefore, serum albumin is an ideal candidate for biopharmaceutical purposes that has shown therapeutic capacity when applied intravenously in TSCI [14].

In the present work, we focused on analysing the physicochemical characteristics of two PPPy/I obtained under different conditions of synthesis. We assessed the rheological behaviour that they present when suspended as powder in BSA solutions to obtain a PPPy/I + BSA system capable of presenting a high viscosity at low shear frequency, as can be expected at the site of injury. Likewise, functional recovery was evaluated in a rat model with TSCI, which was microinjected with a combination of PPPy/I and rat serum albumin (RSA) at the site of injury in the sub-acute stage. Therefore, the surface characteristics of these biomaterials, alone and combined, could affect the biological response in terms of motor function recovery and should be evaluated.

## 2 Material and methods

### 2.1 *In vitro* studies

#### 2.1.1 *Reactive*

BSA and RSA were purchased from Equitech-Bio brand, USA (Cat. BAH68 and RTSA62). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Cellgro (Corning, USA, Cat. No. 46-013-CM). Pyrrole, iodine and acetone reagent (analytical grade) were purchased from Sigma Aldrich Co. and were used directly.

Although most reported studies use BSA, in this study, we used *in vivo* assays with RSA because they share similarities of interest and could minimise the possibility of

an immune response. This was possible since both proteins, bovine and rat, maintained structural evolutionary domains that allow them to be equivalent [12]; thus, the results obtained from the physicochemical characterisation of iodine-doped pyrrole polymers synthesised by plasma (PPPy/I) tested were extrapolated to the behaviour expected in *in vivo* tests.

### 2.1.2 Synthesis of polymers

The iodine-doped pyrrole polymers were synthesised by plasma (PPPy/I) in a cylindrical glass reactor, as previously reported by our research group [15]. The power supplied to the system was 25 watts with a total reaction time of 240 min in alternating cycles of pyrrole and iodine for PPPy/I.1 (P1). On the other hand, alternate cycles of pyrrole, iodine and water were carried out to obtain the PPPy/I.2 (P2). A portion of P1 and P2 recovered from the reactor was ground to a fine powder, while the remaining part was kept as a thin film. Both parts of the polymers (powder and film) were stored under vacuum drying until use.

### 2.1.3 Surface characterisation of both of PPPy/I

Thin films of P1 or P2 were analysed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy using a Perkin-Elmer FT 1600 spectrophotometer. In addition, both PPPy/I films were analysed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) using an X-ray monochromator from an Al  $K\alpha$  (1486.6 eV) source (Thermo Scientific). The data obtained by XPS were analysed by deconvolution using the OriginPro Version 8.1 software.

### 2.1.4 Contact angle tests for albumin adsorption

Glass slides coated with a thin film of PPPy/I.1 or PPPy/I.2 were submerged for 5 min in solutions of BSA in PBS at physiological pH, at different protein concentrations from 0 to 30 mg/mL and at a temperature of  $25 \pm 1$  °C. At the end of the exposure time, the non-adsorbed protein was removed with PBS washes. The slides were placed in a vacuum desiccator for 24 h. Subsequently, analysis of the surface modifications was performed by evaluating the contact angle by the static method. The data were analysed by slopes, graphed with GraphPad Prism Software Version 7.0 and presented as the means  $\pm$  standard error.

### 2.1.5 Rheological tests of PPPy/I suspensions

Flow tests under oscillatory shear rate were performed in a rheometer AR-G2 (TA Instrument, USA), whose least torque detection capability is 0.003  $\mu$ Nm with a resolution of 0.1 nNm. The test was performed within the viscoelastic

linear region under a controlled effort of 95%, with a frequency range of 0.016 to 16 Hz and a ramp of 0.1 to 100 rad/s. Samples consisted of 10 mg/mL of PPPy/I.1 or PPPy/I.2 powder suspended in solution of 0 or 14 mg of BSA per mL of PBS at physiological pH. The geometries used were concentric cylinder (500-micron gap) and cone and plate (cone slope of 1 and 36-micron truncation, plate diameter 60 mm). Measurements were performed at temperatures of 25 and 37 °C controlled with a water recirculation system (RTE-110 Endocal, UK). The data were acquired with the Rheology Advantage Data Analysis TA Instruments Software Version 5.7 and graphed in Prism GraphPad Software Version 7.0.

## 2.2 In vivo studies

### 2.2.1 Traumatic spinal cord injury

All surgical and experimental procedures were performed according to the norms and guidelines established in the Regulation of the General Health Law of Mexico in the field of research for health [16].

Healthy Long Evans strain female rats with a body weight between 250 to 300 g were used. All animals were anaesthetised with ketamine and xylazine (77.5 and 12.5 mg/kg of body weight, respectively) intramuscularly, followed by asepsis and antisepsis protocols. An incision was made in the middle back with the later dissection of the paravertebral muscles to perform a laminectomy at the level of the ninth thoracic vertebra, leaving the spinal cord exposed. Afterward, the animals were placed on the NYU impactor, and a moderate TSCI was produced. The wound was sutured by planes, starting from the paravertebral muscles and ending with the skin. After the surgical procedure, animals received antibiotic (1,200,000 IU of penicillin benzatinic) intramuscularly and an anti-inflammatory (5 mL/2 L of paracetamol in the drinking water) orally. Then, each rat was placed in separate cages, with food and water ad libitum. As part of post-operative care, the intestines and bladder were emptied manually until they regained autonomy. Irritations and skin ulcers due to compression by position were treated topically to avoid infections.

### 2.2.2 Experimental design and microinjection of P1 and P2 suspensions into the injured spinal cord

Two days after the surgical procedure, all animals were anaesthetised again to expose the spinal cord. The animals were randomly selected and assigned to one of the following experimental groups: (V), without lesion and microinjected with 10  $\mu$ L of PBS as vehicle; (RSA), uninjured and microinjected with 10  $\mu$ L of a solution of 14 mg/mL RSA; (P1), without injury and microinjected with 10  $\mu$ L

of a suspension of 10 mg/mL of PPPy/I.1 particles; (P2), without injury and microinjected with 10  $\mu$ L of a suspension of 10 mg/mL PPPy/I.2 particles; (TSCI), animals with traumatic spinal cord injury; (TSCI + RSA), injured and microinjected with 10  $\mu$ L of a solution of 14 mg/mL RSA; (TSCI + P1), injured and microinjected with 10  $\mu$ L of a suspension of 10 mg/mL PPPy/I.1 particles; (TSCI + P1 + RSA), injured and microinjected with 10  $\mu$ L of a suspension composed of 10 mg PPPy/I.1 particles and 14 mg of RSA per mL; (TSCI + P2), injured and microinjected with 10  $\mu$ L of a suspension of 10 mg/mL PPPy/I.2 particles; (TSCI + P2 + RSA), with lesions and microinjected with 10  $\mu$ L of a suspension composed of 10 mg of PPPy/I.2 particles and 14 mg of RSA per mL. Each group consisted of  $n = 6$  animals ( $N = 60$ ). Following the microinjection, the animals were sutured and continued with the post-surgical care protocol previously mentioned.

### 2.2.3 Functional recovery

During the 8 weeks following the microinjection procedure, the assessment of motor function recovery of the hind limb was performed in an open field using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale [17], which consists of 22 points, where zero indicates null mobility of the hind limbs and 21 a normal gait. The first evaluation was done 24 h after TSCI, with the aim to evaluate if animals met the inclusion criteria. Then, functional evaluation was performed once per week by 3 blind observers with a kappa index of 0.7 [18].

### 2.3 Statistical analysis

An exploratory analysis of the data was performed to determine the normal distribution (Kolmogorov–Smirnov's test) and homogeneity of variances applying the Levene's test. The BBB scores were determined by using the

repeated-measures ANOVA, followed by Dunnett's test. All analyses were performed with SPSS 20.0 software, and graphing was performed using GraphPad Prism Version 7.0 software. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The data are presented as the means  $\pm$  standard error.

## 3 Results

### 3.1 In vitro studies

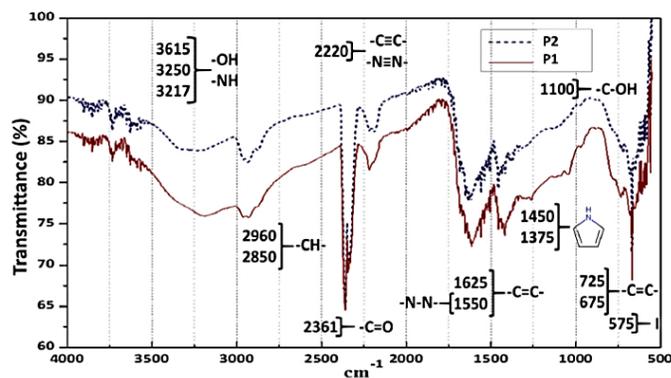
#### 3.1.1 FT-IR spectroscopy

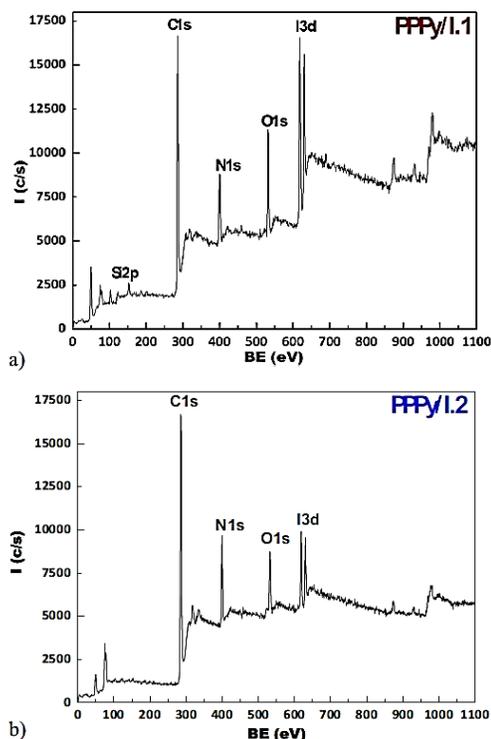
The infrared spectra of PPPy/I.1 (P1) and PPPy/I.2 (P2) are shown in Fig. 1. In both spectra, the presence of a zone between 3500 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  can be shown as functions derived from amines, such as  $-\text{NH}_2$  and  $=\text{NH}$ ,  $-\text{OH}$ . Peaks at 2960 and 2850  $\text{cm}^{-1}$  show the presence of  $-\text{CH}_2$  and  $-\text{CH}_3$  aliphatic. Absorption of  $\text{C}=\text{C}$  and  $\text{C}\equiv\text{N}$  can be seen at 2220  $\text{cm}^{-1}$ . The presence of unsaturated functional groups suggests the loss of hydrogen atoms during the synthesis process. The peaks found at 1625 and 1550  $\text{cm}^{-1}$  are associated with  $\text{C}=\text{C}$  conjugated bond types, which together with the peaks at 1450 and 1375  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of methyl. Furthermore, the same band of 1550  $\text{cm}^{-1}$  overlapped with the signal generated by N-H-type bonds. Moreover, both the peaks at 725  $\text{cm}^{-1}$  and 675  $\text{cm}^{-1}$ , note the presence of  $\text{C}=\text{C}$  groups. Finally, a shoulder found at 575  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the iodine, acting as a dopant in the PPPy/I synthesis.

#### 3.1.2 Elemental analysis by XPS

In this type of analysis, the contribution of each element present in the material is estimated as a percentage. Each

**Fig. 1** FT-IR spectrum of two iodine-doped polypyrroles by plasma (P1 and P2) in percent of transmittance





**Fig. 2** XPS survey spectrum for PPPy/I.1 (P1) and PPPy/I.2 (P2). The peaks correspond to C1s configurations of carbon, N1s of nitrogen, O1s of oxygen, I3d of iodine and Si2p of silicon

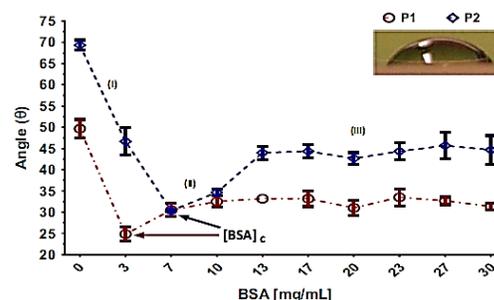
peak corresponds to a value of binding energy in a signal determined in electron volt (eV), which is characteristic for each element analysed, where its intensity (I) corresponds to an arbitrary measure of counts per second (c/s) as seen in Fig. 2. Elemental composition in atomic percentage of the elements carbon (C), nitrogen (N), oxygen (O) and iodine (I) in the powder particles of P1 and P2 is shown in Table 1.

### 3.1.3 Contact angle tests

The behaviour of the contact angle in exposing films of P1 and P2 to different concentrations of BSA is shown in Fig. 3. As the concentration of BSA increases, the performance of the surface chemistry changes due to the adsorption of protein by the polymer surface, resulting in a variation in the contact angle. In this study, a critical concentration point of BSA ( $[BSA]_c$ ) was observed, in which the contact angle grows until it establishes an average value for each polymer. It is also possible to observe the formation of three different

**Table 1** Percent elemental composition of PPPy/I polymers

Element	Atomic %						Relation	
	C1s	N1s	O1s	I3s	Si2p	Others	C/N	O/N
PPPy/I.1 (P1)	70.26	11.36	11.16	1.71	4.93	0.58	6.18	0.98
PPPy/I.2 (P2)	76.13	13.96	6.94	0.72	—	1.67	6.45	0.45



**Fig. 3** Contact angle dependence ( $\theta$ ) on films of two types of PPPy/I exposed to bovine serum albumin (BSA) solutions. Three changes in the angle behaviour, named regions I, II and III, were clearly observed, as well as the point at which a critical concentration of BSA ( $[BSA]_c$ ) was reached as related to the presence of a protein monolayer on the polymer surface

zones of polymer–protein interactions: Region I is associated with the formation of a monolayer from the initial angle to the  $[BSA]_c$ ; Region II is associated with the formation of a multilayer protein system starting at  $[BSA]_c$  until the beginning of Region III, and the latter is characterised by the establishment of a region in which the angle shows a tendency of independence to the BSA concentration.

### 3.1.4 Rheology tests of P1 and P2 with and without albumin

The rheological data under oscillatory shear rate for the suspension of P1 and P2 particles in solution with and without BSA in PBS at physiological pH is shown in Fig. 4. This test was performed at a temperature of 25 °C, and the suspensions were prepared at this temperature prior to being microinjected in the *in vivo* studies. The experimental conditions allowed us to obtain the performance of the elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) modules as a function of the applied frequency. Both modules are related to the degree of structuring or arrangement of the particles within the suspension, which depends on the degree of interaction between particle–particle, BSA–particle and BSA–BSA, whose behaviour is affected by the temperature and the ionic composition of the suspension medium.

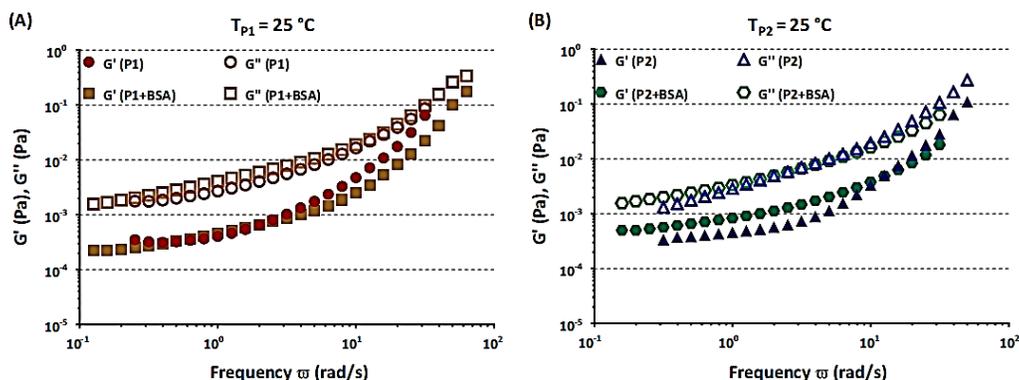


Fig. 4 Rheological behaviour under oscillatory shear rate for suspensions of two PPPy/I particles in solution of BSA at 25 °C. Panel a corresponds to PPPy/I.1 (P1), while panel b corresponds to PPPy/I.2

(P2); in both cases, the concentration of suspended polymer particles was 10 mg/mL, with or without 14 mg/mL of BSA, in PBS at physiological pH

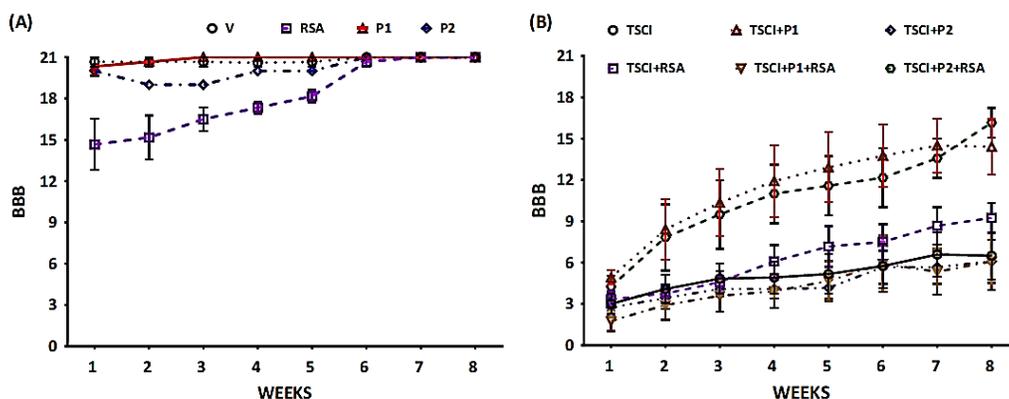


Fig. 5 Evaluation of motor function according to the BBB scale. a Corresponds to the groups without spinal cord injury (TSCI) microinjected with: vehicle (V), serum albumin rat (RSA), PPPy/I.1 (P1) or PPPy/I.2 (P2). b Corresponds to the groups with TSCI and microinjected with P1, P2 and RSA combinations. In the clinical follow-up

of the injured groups, a maximum score on the BBB scale was obtained for the TSCI + P1 (15 ± 1) and TSCI + P2 + RSA (16 ± 1) groups, with a significant difference with respect to the TSCI group ( $p < 0.05$ ). All values correspond to the mean values ± standard error

### 3.2 In vivo studies

#### 3.2.1 Functional recovery

Given the results obtained in the physicochemical characterisation and interaction tests of P1 and P2 with BSA, the *in vivo* assays were performed in rats given the polymer suspension with or without RSA (Fig. 5). The change from BSA to RSA was made in order to avoid possible immunological reactions on the part of the animals. This change is justifiable since both proteins maintain evolutionarily

preserved domains; therefore, one can assume that there will not be changes with respect to the previously observed behaviour of the suspensions. In the study groups without spinal cord injury, we observed that, when they were microinjected with polypyrrole polymers by plasma, the motor function of the control animals was not damaged. Studies in animals with TSCI showed, according to the clinical follow-up, that treatments with PPPy/I.1 (TSCI + P1) or PPPy/I.2 + RSA (TSCI + P2 + RSA) obtained a maximum recovery score of 15 ± 1 and 16 ± 1, respectively, 8 weeks after TSCI (Fig. 5b).

#### 4 Discussion

The IR spectra of the two polymers were very similar; the main difference was that the combination of bands found at 1275 and between 1040 and 1150  $\text{cm}^{-1}$  was associated with C–O–C groups, and this was a weak signal. The contact angle difference implies a different surface, but the IR spectra did not clearly show the difference. One of the main groups responsible for the difference, besides the C–O–C, may be the methyl groups ( $\text{CH}_3$ ), which were in the lines 2960, 2850, 1450 and 1375  $\text{cm}^{-1}$  in the IR spectra, but these lines were also identified with different groups. Furthermore, the secondary amines =N–H of the pyrrole account for the increase in the hydrophobic interaction. Methyl groups as the primary amine imply that some groups are hydrogenated after the ring breakage, and this is possible, especially at low power in the polymerisation. The elements C and N correspond to the pyrrole monomer, whose  $C/N = 4$  is modified during the polymerisation process, obtaining a final  $C/N$  ratio of 6.18 and 5.45 for PPPy/I.1 and PPPy/I.2, respectively. This modification in the  $C/N$  ratio provides evidence of pyrrole ring rupture by allowing some fragments of molecules to escape from the reactor, decreasing the presence of N atoms in the final product. In this analysis, the presence of iodine atoms was also detected, which may be covalently bound or trapped in ionic form as dopants in the formed polymer network.

The presence of oxygen within the elemental analysis indicates that it is not part of the pyrrole molecule but rather came from small vacuum leaks in the reactor and the environment once the reactor opened; in this case, the oxygen was responsible for neutralising free radicals that were still on the surface of the formed polymer. The P2 element could have also obtained the oxygen by the water present during the polymerisation process. Due to the presence of oxygen, it is possible to generate oxidised groups and/or regions in the polypyrrole structure [19]. In the case of PPPy/I.1, the presence of silicon was found as part of its elemental composition; this may have come from the sputtering of the reactor walls. Assuming that the silicon is present as  $\text{SiO}_2$ , then for every 1% of Si there would be a contribution of 2% O in the PPPy/I.1 material; with this, it can be assumed that 9.86% of O related to Si exists, resulting in 1.3% of O present in this polymer. Calculating the  $O/N$  ratio in both materials yielded an  $O/N = 0.11$  for P1, which suggests the incorporation of one atom of oxygen for every ten reactant molecules of pyrrole during the synthesis of P1. In contrast, the  $O/N = 0.45$  of P2 indicates that two molecules of pyrrole are needed to incorporate one oxygen during the synthesis process.

Deconvolution of the dominant peak in each polymer (Fig. 6) allowed us to estimate the functional groups associated with the superficial chemistry with respect to C present in both biomaterials. As mentioned, the formation of

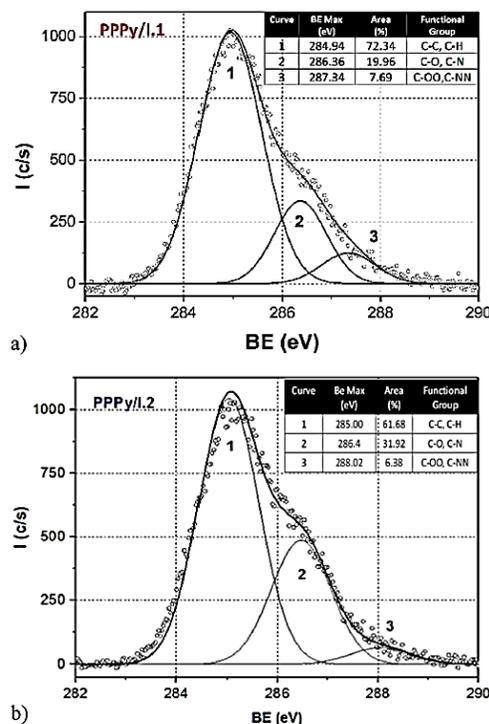


Fig. 6 Analysis by deconvolution of the main peak of C1s obtained by XPS for both polymers

new functional groups absent in the pyrrole monomer is due to the rupture of the pyrrole ring within the ionising gaseous environment established in the reactor during the synthesis process. Functionalities involving oxygen in the case of P1 could be formed by the presence of oxygen in the ambient environment due to leakage in the sealing of the reactor, as well as by the high responsiveness of free surface radicals that did not close prior to ventilation of the reaction system. In the case of P2, the entrance of the water stream into the reactor helped the formation of groups with oxygen in addition to the above-mentioned causes. This can be seen in the deconvolution, since the peak with the energy of 286.4 eV takes a higher percentage, indicating that there are C–O links in the main chain. Both the  $C/N$  and  $O/N$  ratios showed that, even though both polymers exhibited practically the same absorption bands for similar functional groups in the infrared spectrum, when performing the deconvolution analysis of the main peak for the configurations of C1s (Fig. 6), some of the possible functional groups indicated by FT-IR, exposed by each polypyrrole, are different. The effect of these probable groups is most evidenced in the contact angle tests.

Determination of the contact angle or wettability is a tool that allows study of the hydrophilic and hydrophobic capacity of a material depending on the surface functional groups. Therefore, such tests in thin layer are a measure that can be extrapolated to suspended particles of the same material. Since the surface chemistry exposed to the surrounding environment was the same in both cases, these suspended particles exhibited a larger surface area relative to the thin layer.

In this study, the change in contact angle of both biomaterials was determined when they were exposed to increasing concentrations of BSA, which was dissolved in PBS with an osmolarity and a concentration of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ions similar to that present in the extracellular fluid of mammals. In particular, in an ionic medium such as PBS at physiological pH, intramolecular interactions that stabilise the three-dimensional structure in any type of serum albumin, setting up a negative charge density around it, are fostered. The presence of an ionic medium involved in the electrochemical performance of the functional groups in the adsorption process of albumin onto the surface of any biomaterial is highly relevant, as suggested by Zhang and collaborators [20].

In this sense, the typical adsorption behaviour of albumin on different materials results in the modification of the

contact angle depending on the concentration of albumin to which the material studied has been exposed, clearly establishing three regions of adsorption (Fig. 7) [21, 22]. These regions were observed by exposing slides coated with thin films of P1 or P2 to BSA solutions at different concentrations, each region being the change in the domain of functional groups exposed by the surface; these groups provide surface hydrophilicity by the presence of  $\text{NH}_2$ , OH, CO and COOH groups and hydrophobicity by  $\text{CH}_3$  groups, saturated rings and aliphatic groups. Thus, in contrast with the results obtained by Keselowsky and collaborators [23], as well as Azioune and collaborators [21], one can assume that the surface of P1 could be dominated by  $\text{NH}_2$ , COOH and OH groups, whereas in P2, the  $\text{CH}_3$ ,  $\text{NH}_2$  and COOH predominate groups, but mainly  $\text{CH}_3$  groups that would confer hydrophobicity at the beginning of the test. These groups are congruent with those estimated by the deconvolution analysis of the XPS results.

For this study, the contact angle exceeding  $60^\circ$  was considered as a hydrophobic surface, as it was possible to associate this feature with P2 because it initially showed a contact angle of  $69.3^\circ \pm 2.9$ . This is in agreement with the literature, which claims that the contact angle may be related to the presence of aliphatic and unsaturated groups

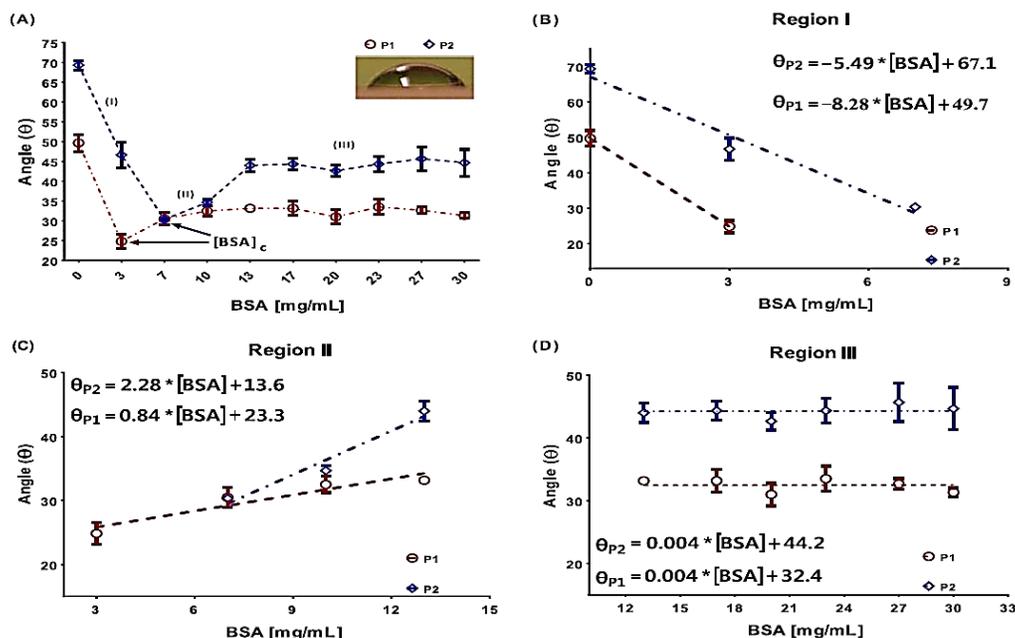


Fig. 7 Contact angle seen on PPPy/I films exposed to BSA. I, II and III show the different regions of the surface behaviour of PPPy/I when interacting with BSA dissolved in PBS at physiological pH. Each point

is the mean  $\pm$  standard error of six different points. The slope analysis showed a significant difference ( $p < 0.01$ ) by the slopes of regions I and II

[23, 24]. These groups arise because of the loss of H and some C and N associated with them during the synthesis process, as suggested by the XPS data. Considering only the contribution of the unsaturation to the surface electrostatic behaviour of P2, one can suppose that the surface of this material has an electrostatically negative density with some positive regions, which may explain the predominantly hydrophobic behaviour.

Furthermore, in the case of P1, the initial value of the contact angle corresponded to  $49.7^\circ \pm 5.3$ , which is similar to that expected for rich surfaces with  $\text{NH}_2$  groups [23]. Therefore, a hydrophilic surface was established, i.e., with a predominantly positive surface electrostatic charge with some negative regions. In both cases, as the BSA concentration increased, the average value of the contact angle decreased until that a minimum value was obtained for each polymer (Fig. 7b). This value shows the existence of a critical concentration of BSA ( $[\text{BSA}]_c$ ), in which the adsorption process of BSA reaches a maximum limit of interaction between the available surface space by P1 and P2 with respect to the protein concentration. In other words, there is a point at which it has formed a monolayer of BSA on the polymer surface. In this way, at this  $[\text{BSA}]_c$ , the functional groups exposed at this point would correspond to -OH groups for P1 and -COOH groups for P2 [23] because of the structural rearrangement of the BSA molecules adsorbed by the surfaces. With this  $[\text{BSA}]_c$ , the end of region I and the beginning of region II were found.

Once exhausted, the exposed surface area per polymer given its  $[\text{BSA}]_c$ , the behaviour of the contact angle shows a tendency to recover the observed value up to a maximum angle (Fig. 7c). This increase is evidence of the formation of a multilayer BSA system on the surface of both polymers. These layers grow into an independent state concentration

where BSA molecules that emerge from the last layers would be replaced by new molecules of the surrounding medium during exposure. At this point of interaction, the last layers of BSA are responsible for exposing functional groups, such as -NH, -OH and -COOH, belonging to the free polar residues that constitute the conformational rearrangement of BSA, which are highly dependent on the physiological pH. Finally, the contact angle is set at an average value for each polymer, being  $32.5^\circ \pm 1.24$  for PPPy/I.1 and  $44.2^\circ \pm 1.24$  for PPPy/I.2. These values are independent of BSA increments (Fig. 7d), at least up to the maximum tested concentration of 30 mg/mL, as already mentioned. Once this point has been reached, a multilayer BSA system is set up that reaches a packaging and hydration limit [20, 25, 26], with which a steady state is reached within the exposure time in the BSA solutions.

The suspensions show a tendency towards a frequency independence zone characterised by a plateau form at 25 °C (Fig. 4), which sets up a semisolid behaviour at very low frequencies. By increasing the temperature to 37 °C (Fig. 8), the polymer suspensions P1 and P2 without BSA do not show plateau formation at very low frequencies, having a behaviour similar to that of an unstructured polymer suspension, which tends to flow regardless of the frequency of shear applied to the suspension. The importance of this study lies in the fact that both suspensions were later microinjected in *in vivo* tests; thus, it was of interest to know whether, once inside the spinal cord, the polymer would flow through it or would still be at the test site. As shown in Fig. 8, the  $G'$  module of P1 + BSA and P2 + BSA showed the behaviour of a fluid structured from frequencies smaller than 2 rad/s. In the case of the P2 + BSA combination (Fig. 8b), it shows the expected characteristics of a structured system at low frequencies at 37 °C, which is

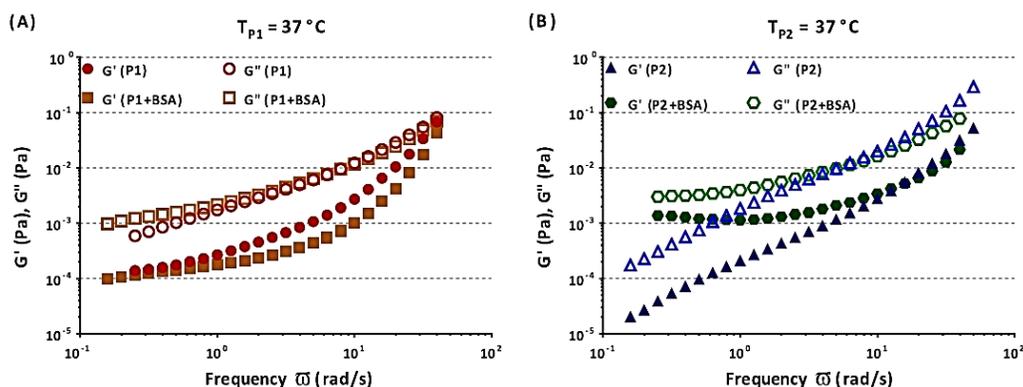


Fig. 8 Rheological behaviour under oscillatory shear rate for suspensions of two PPPy/I particles in BSA solution at 37 °C. Panel a corresponds to PPPy/I.1 (P1), while panel b corresponds to PPPy/I.2

(P2); in both cases, the concentration of suspended polymer particles was 10 mg/mL with or without 14 mg/mL of BSA used as a medium of PBS suspension at physiological pH

desirable for biological applications in the treatment of TSCI. This means that the interactions within the suspension allowed a system that, at 25 °C, is able to flow during the microinjection process. However, once this suspension reaches body temperature, it behaves as a structured system that will mostly remain at the application site. Such behaviour was not shown in any of the other concentration-temperature combinations analysed.

Dynamic rheology at 37 °C, shown in Fig. 8, considers the body temperature that will prevail within the animals at which P1 and P2 particle suspensions will remain exposed once microinjected. P1 shows a behaviour obtained at 25 °C, and either the polymer or the BSA-polymer suspension shows a tendency to lose the frequency dependence, implying that they are no longer classical viscous fluids due to the interaction. It is important to note that, in the case of P2, the behaviour of the polymer suspension is similar to a viscous fluid, showing that the change of  $G''$  and  $G'$  are almost linear. Once BSA is present, the rheology changes, such that  $G'$  is now fairly close to the  $G''$ , and both tend to be independent of the frequency. The meaning of this behaviour is that the polymer-protein interaction promotes a stiff material function that has difficulty flowing, and should still be longer in the place of microinjection, which is the main idea.

The BBB scores were evaluated using the ANOVA of repeated measures followed by Dunnett's test, there was a significant difference ( $p = 0.002$ ) between the V and RSA groups. The same test showed that neither the V, P1 nor P2 generated significant changes in the gait of the experimental animals. Therefore, it can be assumed that none of them caused any irreversible damage in the tissue of the spinal cord. From the clinical point of view, when these four groups were followed up weekly, it was observed that the gait of the animals of the RSA group was affected, falling from a value of 21 to  $15 \pm 1$  on the BBB score in the first week of evaluation, at least at a concentration of 14 mg/mL of RSA. However, during the next weeks, this same group reached values of normal gait, indicating that the organism can compensate the presence of an overload of RSA until restoring the normal functions in the long term.

On the other hand, studies in animals with TSCI showed, according to the clinical follow-up, that treatments with P1 and P2 + RSA allowed a maximum recovery score in the 8 weeks after TSCI, obtaining  $15 \pm 1$  and  $16 \pm 1$ , respectively (Fig. 5b). These groups showed a significant difference with respect to the TSCI group without treatment, maintaining a mean value of  $12 \pm 1$  ( $p = 0.015$  for the P1 group) and  $11 \pm 1$  ( $p = 0.031$  for the P2 + RSA group) as seen in Fig. 7b. The behaviour of both suspensions was very similar from the clinical point of view; according to the statistics, there was no significant difference between them.

Such behaviour can be interpreted according to the contact angle data. These data suggest that the surface of P1

would be dominated by  $-NH_2$  groups, whereas P2 requires the formation of the system of multilayer albumin for presenting the surface enrichment by  $-NH_2$  groups. Even more, it should be considered that the P2-RSA interaction processes would be so narrow that they help increase the internal organisation of the suspension (Fig. 7b) by increasing the ability to interact with damaged tissue once the P2 + RSA combination enters the site of injury, i.e., the functional groups exposed by RSA in the multilayer onto the material, providing the appropriate characteristics to have a favourable biological role in the functional recovery after TSCI. On the other hand, for P2 and the combination of P1 + RSA, where the chemistry of the surface is interchanged, i.e., P1 would expose  $-COOH$  and  $-OH$  groups, as well as possibly some  $-CH_3$  and  $-NH_2$  groups from the RSA multilayer system, these functional groups are characteristic of P2 on their surface, as suggested by the XPS and contact angle studies. These changes in the chemistry of the surface were relevant since, as shown in Fig. 5b, the BBB values were not positive for functional recovery after a TSCI.

## 5 Conclusions

The *in vivo* tests in uninjured animals established that when the vehicle, PPPy/L1 (P1) or PPPy/L2 (P2) was administered in healthy nervous tissue, its functions were not altered; thus, its gait was not affected in the short or long term. In the case of albumin in animals without lesions, their motor functions were affected in the short and medium term, with an almost complete recovery in the long term. Therefore, we can conclude that the administration of plasma pyrrole polymers does not represent a risk for the performance of motor functions in healthy tissue.

XPS deconvolution analysis of the peak for C1s allowed the establishment of surface functional groups present in P1 and P2, which were congruent with the FT-IR spectra. The contact angle test is a consequence of these groups, showing that P1 has a more hydrophilic surface than P2. Furthermore, the same contact angle test made it possible to observe that the surface chemistry of these biopolymers changes depending on the concentration of albumin to which it is exposed. Therefore, it was possible to determine the critical protein concentration required to form a monolayer of protein on the surface of both polymers. Likewise, we obtained data that allowed us to think of the formation of a stable multilayer protein system on the surface of the biomaterials. This multilayer system showed a drastic change in the behaviour of P1 and P2, with severe repercussions in the *in vivo* assays, since both polymers drastically changed the archived BBB score when interacting with the protein. P2 with albumin had the larger score of  $16 \pm 1$ , and it reduced strongly without the protein ( $6 \pm 0.4$ ); in

the case of P1, the BBB score without albumin was  $15 \pm 1$ , and with protein, it was  $6 \pm 0.5$ .

Rheological data in the oscillatory shear regime of the particle suspensions of both PPPy/I evidenced the capacity of the interaction of P1 and P2 with the protein albumin, obtaining a semisolid-like behaviour at low frequencies near body temperature; this phenomenology is of interest to microinjection as a treatment for TSCI, hoping that the PPPy/I particles remain at the site of injury for longer. However, the *in vivo* test results showed that the surface interaction of the protein took the main role in the motor evolution of the animals.

**Acknowledgements** We wish to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the partial support for the realisation of this work through project CONACYT-15523 and by the doctoral scholarship number 327854 that Omar Fabela received. Thanks to the Fundación IMSS for the support of Hermelinda Salgado-Ceballos.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Center NSCIS. Facts and figures at a glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham; 2016.
- Morales J, Olayo MG, Cruz GJ, Castillo-Ortega MM, Olayo R. Electronic conductivity of pyrrole and aniline thin films polymerized by plasma. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*. 2000;38:3247–55. [https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20001215\)38:24<3247::AID-POLB60>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20001215)38:24<3247::AID-POLB60>3.0.CO;2-U).
- Zuñiga-Aguilar E, Godínez R, Ramírez-Fernández O, Morales J, Olayo R. Development of a neuromuscular junction model on surfaces modified by plasma polymerization. *Rev Mex De Ing Bioméd*. 2013;34:217–26.
- Zuñiga-Aguilar E, Olayo R, Ramírez-Fernández O, Morales J, Godínez R. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;25:729–47. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.898124>.
- Olayo R, Alvarez-Mejía AL, Mondragon-Lozano R, Escalona A, Morales C, Morales J et al. Implante de polímeros sintetizados por plasma en lesión de médula. In: GarcíaColín L, Dagdug L, Picquart M, editors. *La Física biología en México: Temas selectos Colegio Nacional*; 2008. p. 195–205.
- Cruz GJ, Mondragón-Lozano R, Díaz-Ruiz A, Manjarrez J, Olayo R, Salgado-Ceballos H, et al. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J Mater Sci: Mater Med*. 2012;23:2583–92. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4715-2>.
- Alvarez-Mejía AL, Morales J, Cruz GJ, Olayo MG, Olayo R, Díaz-Ruiz A, et al. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *J Mater Sci: Mater Med*. 2015;26:1–11. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5541-0>.
- Di Bari L, Ripoli S, Salvadori P. Serum albumin and natural products. In: Gyula P, Claudia Z, Luciano C, editors. *Progress in biological chirality*. Oxford: Elsevier Science Ltd; 2004. p. 271–95.
- Peters T Jr. Ligand binding by albumin. In: Peters T, editor. *All about albumin*. San Diego: Academic Press; 1995. p. 76–132.
- Saroff HA, Lewis MS. The binding of calcium ions to serum albumin. *J Phys Chem*. 1963;67:1211–6. <https://doi.org/10.1021/j100800a011>.
- Gum ET, Swanson RA, Alano C, Liu J, Hong S, Weinstein PR, et al. Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. *Stroke*. 2004;35:590–5. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000110790.05859.DA>.
- Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Asp Med*. 2012;33:209–90. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.
- Peters T Jr. Historical perspective. In: Peters T, editor. *All about albumin*. San Diego: Academic Press; 1995. p. 1–8.
- Cain LD, Nie L, Hughes MG, Johnson K, Echetebeu C, Xu GY, et al. Serum albumin improves recovery from spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2007;85:1558–67. <https://doi.org/10.1002/jnr.21265>.
- Cruz GJ, Morales J, Olayo R. Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films*. 1999;342:119–26. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(98\)01450-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(98)01450-3).
- Bioethic NCo. Regulations for research. In: General Health Law. 2014. <http://www.cgajdh.salud.gob.mx/descargas/LV/43-RLGSMIS.pdf>.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12:1–21.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159–74. <https://doi.org/10.2307/2529310>.
- Gengenbach TR, Chatelier RC, Griesser HJ. Universal correlation of nitrogen 1s and oxygen 1s photoelectron binding energies with chemical composition in nitrogen-containing plasma polymers. *Plasma Polym*. 1999;4:283–307. <https://doi.org/10.1023/a:1021831527895>.
- Zhang Z, Dou J, Yan F, Zheng X, Li X, Fang S. Plasma polymerized pyrrole films for biological applications: correlation between protein adsorption properties and characteristics. *Plasma Process Polym*. 2011;8:923–31. <https://doi.org/10.1002/ppap.201000156>.
- Azioune A, Siroti F, Tanguy J, Jouini M, Chehimi MM, Miksa B, et al. Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films. *Electrochim Acta*. 2005;50:1661–7. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.10.014>.
- Białopiotrowicz T, Jaficzuk B. Wettability and surface free energy of bovine serum albumin films. *J Surfactants Deterg*. 2001;4:287–92. <https://doi.org/10.1007/s11743-001-0181-5>.
- Keselowsky BF, Collard DM, Collard DF, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66A:247–59. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10537>.
- Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;55:90–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.021>.
- Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*. 2012;33:1201–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.059>.
- Ahmed MH, Byrne JA, McLaughlin J. Kinetics and thermodynamics of human serum albumin adsorption on silicon doped diamond like carbon. *Mater Chem Phys*. 2015;154:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.01.048>.

# **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Morales J, Olayo MG, Cruz GJ, Castillo-Ortega MM, Olayo R. Electronic conductivity of pyrrole and aniline thin films polymerized by plasma. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2000;38(24):3247-55.
2. Zuñiga-Aguilar E, Godínez R, Ramírez-Fernández O, Morales J, Olayo R. Development of a Neuromuscular Junction Model on Surfaces Modified by Plasma Polymerization. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 2013;34(3):217 - 26.
3. Zuniga-Aguilar E, Olayo R, Ramirez-Fernandez O, Morales J, Godinez R. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2014;25(7):729-47.
4. Olayo R, Alvarez-Mejía AL, Mondragon-Lozano R, Escalona A, Morales C, Morales J, et al. Implante de polímeros sintetizados por plasma en lesión de médula. In: garcíacolín L, Dagdug L, Picquart, editors. *La Física biología en México: Temas selectos. 2: Colegio Nacional; 2008. P. 195 - 205.*
5. Cruz GJ, Mondragón-Lozano R, Diaz-Ruiz A, Manjarrez J, Olayo R, Salgado-Ceballos H, et al. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Journal of Material Science: Material in Medicine*. 2012;23(10):2583-92.
6. Alvarez-Mejia AL, Morales J, Cruz GJ, Olayo MG, Olayo R, Díaz-Ruíz A, et al. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *Journal of Material Science: Material in Medicine*. 2015;26(7):1-11.
7. Di Bari L, Ripoli S, Salvadori P. Serum Albumin and Natural Products. In: Gyula P, Claudia Z, Luciano cagliotia2 - Gyula Pályi CZ, Luciano C, editors. *Progress in Biological Chirality*. Oxford: Elsevier Science Ltd; 2004. P. 271-95.
8. Peters Jr T. 3 - Ligand Binding by Albumin. In: Peters T, editor. *All About Albumin*. San Diego: Academic Press; 1995. P. 76-132.
9. Saroff HA, Lewis MS. The binding of calcium ions to serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry*. 1963;67(6):1211-6.
10. Gum ET, Swanson RA, Alano C, Liu J, Hong S, Weinstein PR, et al. Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. *Stroke*. 2004;35(2):590-5.
11. Diaz-Ruiz A, Rios C, Carvajal-Sotelo J, Ortiz-Plata A, Espino-Solis GP, Mendez-Armenta M, et al. Neuroprotective effect of DAHK peptide in an occlusive model of permanent focal ischemia in rats. *Neurochemical research*. 2010;35(2):343-7.
12. Peters Jr T. 1- Historical Perspective. In: Peters T, editor. *All About Albumin*. San Diego: Academic Press; 1995. P. 1-8.
13. Bronzino JD. *Biomedical engineering fundamentals*. 3 ed: CRC Press; 2006.
14. Shi D. *Biomaterials and tissue engineering*. Biological and Medical Physics, editor: Springer; 2004.

15. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions*: Wiley-Liss; 2002.
16. Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28(34):5068 - 73.
17. Martinelly M, Froimowicz P, Calderon M, Strumia M. Materiales poliméricos funcionalizados. Parte 1: Síntesis y polimerización de monómeros funcionalizados. *Revista Iberoamericana de Polimeros*. 2003;4(4):30 - 47.
18. Abraham GA, Cuadrado TR. Métodos de caracterización de biomateriales. In: Sastre R, Aza Sd, San Roman J, editors. *Biomateriales*. Faenza Italia: Faenza Editrice Ibérica S.L.; 2004. P. 173 - 96.
19. Feng X, Zhang J, Xie H, Hu Q, Huang Q, Liu W. The RF plasma polymer of lysine and the growth of human nerve cells on its surface. *Surface and Coatings Technology*. 2002;171(1-3):96-100.
20. Khatayevich D, Gungormus M, Yazici H, So C, Cetinel S, Ma H, et al. Biofunctionalization of materials for implants using engineered peptides. *Acta biomaterialia*. 2010;6(12):4634-41.
21. Khan W, Kapoor M, Kumar N. Covalent attachment of proteins to functionalized polypyrrole-coated metallic surfaces for improved biocompatibility. *Acta biomaterialia*. 2007;3(4):541-9.
22. Garcia AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*. 2005;26(36):7525-9.
23. Ratner BD, Bryant SJ. BIOMATERIALS: Where We Have Been and Where We are Going. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2004;6(1):41-75.
24. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*. 2004;25(28):5947-54.
25. Holmes TC, de Lacalle S, Su X, Liu G, Rich A, Zhang S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(12):6728-33.
26. Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(8):3334-8.
27. Zhang Z, Dou J, Yan F, Zheng X, Li X, Fang S. Plasma Polymerized Pyrrole Films for Biological Applications: Correlation Between Protein Adsorption Properties and Characteristics. *Plasma Processes and Polymers*. 2011;8(10):923-31.
28. Cruz GJ, Olayo G, Salgado H, Diaz A, Rios C, Olayo R, et al. Estrategia para el tratamiento de lesiones por sección completa de médula espinal basada en implantes de polímeros sintetizados por plasma. In: Duque Mojica G, Jiménez Reyes M, Monroy Guzmán F, Romero Hernández S, Serment Guerrero J, editors. *Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al avance de la Ciencia y la Tecnología en México*. México: ININ; 2010. P. 11 - 28.

29. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2002;36(5–6):143-206.
30. Cruz GJ, Morales J, Olayo R. Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin Solid Films*. 1999;342(1–2):119-26.
31. Perry RH, Perry RR, Green DW, Maloney JO. *Manual Del Ingeniero Químico*: mcgraw-Hill/Interamericana de Espana, S.A.; 2001.
32. Barnes HA. *A Handbook of Elementary Rheology*. University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics. 2000. P. 200.
33. Geankoplis CJ. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*: Compañía Editorial Continental; 1998.
34. Rao MA. *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods. Principles and Applications*. Cánovas GVB-, editor: Springer Science; 2014. 470 p.
35. Krishnan JM, Deshpande AP, Kumar PBS. *Rheology of Complex Fluids*. Krishnan JM, Deshpande AP, Kumar PBS, editors: Springer New York; 2010 2010/01/01. 259 p.
36. Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(18):7123-8.
37. Tadros TF. *Rheology of Dispersions: Principles and Applications*: Wiley; 2010.
38. Macosko CW. *Rheology: principles, measurements, and applications*: VCH; 1994.
39. Afifi AK, Bergman RA. *Neuroanatomía Funcional: Texto y atlas*. 2 ed. México: mcgraw - Hill; 2006.
40. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de neurociencia 4 Ed*: mcgraw-Hill Interamericana de España; 2001.
41. Braillon MG. *El sistema nervioso central*. 3 ed: Morata; 1992 1992.
42. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. Médica Tdf, editor. España: ELSEVIER 2011. 1092 p.
43. Snell RS. *Neuroanatomía clínica*. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
44. University AB. *Lesión de la médula espinal: Datos y Cifras a la Vista*. National Spinal Cord Injury Statistical Center; 2012.
45. Mondragón-Lozano R, Díaz A, García T, Salgado H, Olayo R, Morales J, et al. Evaluación electrofisiológica del efecto de tres implantes poliméricos en la función nerviosa en un modelo de lesión por sección completa de la médula espinal en ratas. In: Müller-Karger C, Wong S, Cruz A, editors. *IV Latin*

American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health. IFMBE Proceedings. 18: Springer Berlin Heidelberg; 2008. P. 654-8.

46. Anderson KD. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. *Journal of neurotrauma*. 2004;21(10):1371-83.

47. Sánchez PN, Hernández J, Peralta J, Rojano M, Castañeda R. Evaluación de la actividad y participación del paciente con lesión medular a través de un cuestionario basado en CIF (Calificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud) en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación*. 2010;22(4):113 - 7.

48. Estrada-Mondaca S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid mdc, León CI-Pd, Velasquillo-Martínez C, Vacanti CA, et al. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*. 2007;49:437-44.

49. Straley KS, Foo CW, Heilshorn SC. Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(1):1-19.

50. Baumann MD, Kang CE, Stanwick JC, Wang Y, Kim H, Lapitsky Y, et al. An injectable drug delivery platform for sustained combination therapy. *Journal of controlled release*. 2009;138(3):205-13.

51. Thuret S, Moon LDF, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(8):628-43.

52. Caballero Chacón S, Nieto - Sampedro M. Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura. *Veterinaria Mexicana*. 2005;36(1):75 - 86.

53. Bradbury EJ, mcmahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(8):644-53.

54. Silver JF, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(2):146 - 56.

55. Cain LD, Nie L, Hughes MG, Johnson K, Echetebe C, Xu GY, et al. Serum albumin improves recovery from spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2007;85(7):1558-67.

56. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in physiology education*. 2002;26(1-4):238-55.

57. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. In: mckerracher L, Doucet G, Rossignol S, editors. *Progress in brain research*. Volume 137: Elsevier; 2002. P. 37-47.

58. Tortora GJ, Anagnostakos NP. La médula espinal y los nervios espinales. *Principios de anatomía y fisiología 6ed*. México: HARLA; 1993. P. 413 - 50.

59. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(3):209 - 90.

60. Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan M, Subbarao N, Khan RH. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality*. 2010;22(1):77-87.
61. Throop JL, Kerl ME, Cohn LA. Albumin in health and disease: protein metabolism and function. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. 2004;26(12):932 - 8.
62. Peters TJ. *All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. USA: Academic Press; 1995.
63. Mclachlan AD, Walker JE. Evolution of serum albumin. *Journal of molecular biology*. 1977;112(4):543-58.
64. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*. 2012;52(3-4):174-82.
65. Akdogan Y, Reichenwallner J, Hinderberger D. Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity. *Plos one*. 2012;7(9):e45681.
66. Hureau C, Eury H, Guillot R, Bijani C, Sayen S, Solari P-L, et al. X-ray and Solution Structures of cuiighk and cuiidahk Complexes: Influence on Their Redox Properties. *Chemistry – A European Journal*. 2011;17(36):10151-60.
67. Prajapati KD, Sharma SS, Roy N. Current perspectives on potential role of albumin in neuroprotection. *Reviews in the neurosciences*. 2011;22(3):355-63.
68. Wang YF, Gwathmey JK, Zhang G, Soriano SG, He S, Wang Y. Cerebrospinal fluid may mediate CNS ischemic injury. *Cerebrospinal fluid research*. 2005;2:7.
69. Eady TN, Khoutorova L, Atkins KD, Bazan NG, Belayev L. Docosahexaenoic acid complexed to human albumin in experimental stroke: neuroprotective efficacy with a wide therapeutic window. *Experimental & translational stroke medicine*. 2012;4(1):19.
70. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;310(2):173-86.
71. Jimenez Hamann MC, Tsai EC, Tator CH, Shoichet MS. Novel intrathecal delivery system for treatment of spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2003;182(2):300-9.
72. Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(13):2499-506.
73. Rungseevijitprapa W, Bodmeier R. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2009;36(4-5):524-31.
74. Wang X, Gu X, Yuan C, Chen S, Zhang P, Zhang T, et al. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;68A(3):411-22.

75. Cruz GJ, Olayo MG, López OG, Gómez LM, Morales J, Olayo R. Nanospherical particles of polypyrrole synthesized and doped by plasma. *Polymer*. 2010;51(19):4314-8.
76. Olayo R, Rios C, Salgado-Ceballos H, Cruz GJ, Morales J, Olayo MG, et al. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2008;19(2):817-26.
77. Cruz GJ, Morales J, Castillo-Ortega MM, Olayo R. Synthesis of polyaniline films by plasma polymerization. *Synthetic Metals*. 1997;88(3):213-8.
78. Bioethic nco. Regulations for Research 2014 [updated 18/02/2017. Available from: <http://www.cgajdh.salud.gob.mx/descargas/LV/43-RLGSMIS.pdf>.
79. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
80. Lapham LW, Johnstone MA, Brundjar KH. A New Paraffin Method for the Combined Staining of Myelin and Glial fibers. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1964;23(1).
81. Jachimska B, Pajor A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*. 2012;87:138-46.
82. Kopac T, Bozgeyik K, Yener J. Effect of ph and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008;322(1-3):19-28.
83. Białopiotrowicz T, Jańczuk B. Wettability and surface free energy of bovine serum albumin films. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2001;4(3):287 - 92.
84. Azioune A, Siroti F, Tanguy J, Jouini M, Chehimi MM, Miksa B, et al. Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films. *Electrochimica Acta*. 2005;50(7-8):1661-7.
85. Keselowsky BF, Collard DM, Collard DF, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;66A(2):247 - 59.
86. Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2007;55(1):90-7.
87. Ahmed MH, Byrne JA, mclaughlin J. Kinetics and thermodynamics of human serum albumin adsorption on silicon doped diamond like carbon. *Materials Chemistry and Physics*. 2015;154:84-93.
88. Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*. 2012;33(5):1201-37.
89. Inoue H, Matsumoto T. Viscoelastic characterization of solid-like structure in aqueous colloids of globular proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996;109(0):89-96.

90. Castellanos MM, Pathak JA, Colby RH. Both protein adsorption and aggregation contribute to shear yielding and viscosity increase in protein solutions. *Soft Matter*. 2014;10(1):122-31.
91. Chodankar S, Aswal VK, Hassan PA, Wagh AG. Effect of pH and Protein Concentration on Rheological and Structural Behavior of Temperature-induced Bovine Serum Albumin Gels. *Journal of Macromolecular Science, Part B*. 2010;49(4):658-68.
92. Ortiz-Zarama MA, Jiménez-Aparicio AR, Lourenço RV, Amaral-Sobral PJ, Solorza-Feria J. Rheological characterization of solutions of gelatin with bentonite and tannic acid. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2016;15(3).
93. Cross MM. Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*. 1965;20(5):417-37.
94. Guerra-dellavalle D, Sánchez-Rivera MM, Zamudio-Flores PB, Méndez-Montevalvo G, Bello-Pérez LA. EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION TYPE ON PHYSICOCHEMICAL AND RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BANANA STARCH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2009;8(2).
95. Pathology afio. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology: Blakiston Division, mcgraw-Hill; 1968. 258 p.*

# **GLOSARIO.**

---

<b>Adolecer</b>	Caer enfermo o padecer alguna enfermedad habitual.
<b>Afección</b>	Sinónimo de dolencia, enfermedad, padecimiento, indisposición, alteración, achaque.
<b>Agujero magno</b>	Nombre del orificio mayor situado en la parte pósteroinferior del cráneo (base del cráneo, piso ténporo occipital), a través del cual se establece la continuidad del sistema nervioso central hacia la médula espinal. El agujero magno también es conocido como <i>foramen magnum</i> .
<b>Aracnoides</b>	Del griego <i>arachnoeides</i> = parecido a una telaraña. Capa meníngea media del encéfalo y la médula espinal que se conoce así por las trabéculas parecidas a una telaraña que se extienden de la aracnoides a la piamadre subyacente.
<b>Astrocito</b>	Del griego <i>astron</i> = estrella y <i>kytos</i> = vaso hueco. Célula parecida a una estrella; los procesos del astrocito confieren una forma estelar.
<b>Atlas</b>	Nombre que recibe el hueso superior de toda la columna vertebral, siendo este la primera vértebra cervical (C1). Esta vértebra, al articularse con el hueso occipital sostiene la cabeza.
<b>Axón</b>	Del griego <i>axon</i> = eje. Proyección de una neurona por la cual se conducen los impulsos nerviosos. Al pasar a través de sus vainas tubulares, el axón forma el eje del nervio. Robert Remak describió en 1838 este cilindroeje de fibras nerviosas amielínicas.
<b>Axonopatía</b>	Enfermedad, lesión o degeneración de los axones
<b>Axonotmesis</b>	Lesión de un nervio periférico que produce discontinuidad de axones con preservación de las vainas de tejido conjuntivo de apoyo.
<b>Barrera hematoencefálica</b>	Barrera física entre los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central. De no existir esta barrera muchas sustancias nocivas llegarían al cerebro afectando su funcionamiento y tornando inviable al organismo. Las células de la barrera poseen proteínas específicas que transportan de forma activa sustancias como la glucosa a través de la barrera.
<b>Biomaterial</b>	Cualquier sustancia diferente a un fármacos o combinación de sustancias sintéticas o de origen natural, que pueden ser utilizados en cualquier instante, como un todo o parte de un sistema que trata, aumenta, o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo
<b>Celoidina</b>	Sustancia procedente de la evaporación incompleta del colodión obteniendo una mezcla de dinitro y trinicelulosa, que se emplea en fotografía, cirugía y para incluir preparaciones microscópicas.
<b>Compósito</b>	Sustancia compuesta de dos o más elementos diferentes entre sí.
<b>Cono axónico</b>	Parte del pericarion de una neurona que da inicio al axón

---

<b>Cromatólisis</b>	Del griego <i>chromatos</i> = color y <i>lysis</i> = disolución o ruptura. Disolución de los cuerpos de Nissl de una neurona como resultado de la lesión de su axón.
<b>Cuerpos de Nissl</b>	Retículo endoplasmático granuloso de las neuronas. Se conocen así en honor al neurólogo alemán Franz Nissl, quien los descubrió en 1884.
<b>Cuerpos de Nissl</b>	Retículo endoplasmático granuloso de las neuronas. Se conocen así en honor al neurólogo alemán Franz Nissl, quien los descubrió en 1884.
<b>Dalton</b>	Unidad de masa molecular equivalente a la masa de un átomo de hidrógeno ( $1,66 \times 10^{-24}$ gramos).
<b>DAPI</b>	4',6 – diamidino – 2 - fenilindol, es un colorante fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en adenina y timina en el ADN por lo que se utiliza ampliamente en la microscopía de fluorescencia. DAPI puede pasar a través de una membrana celular intacta por lo tanto puede ser utilizado para teñir las células tanto en vivo como fijadas.
<b>Degeneración Walleriana</b>	Cambio en un axón y su vaina de mielina distales en relación con el sitio de lesión del axón. Se llama así en honor de Augustus Waller, fisiólogo inglés que describió el fenómeno entre 1850 y 1852.
<b>Dendrita</b>	Del griego <i>dendron</i> = árbol. Procesos de las neuronas que pueden ramificarse en forma parecida a un árbol.
<b>Disco intervertebral</b>	Formación de naturaleza fibrocartilaginosa en forma de disco que se interpone entre la zona de contacto de dos vértebras contiguas. Su función es facilitar los movimientos de flexión, extensión y lateralización, además de actuar como lubricante y amortiguador de las cargas que sufre la columna vertebral.
<b>Dominio</b>	Región de una proteína con estructura terciaria distintiva, por ejemplo, globular o forma de bastón, y actividad característica; puede haber dominios homólogos en diferentes proteínas.
<b>Duramadre</b>	Del latín <i>durus</i> = duro y <i>mater</i> = madre. Recubrimiento meníngeo duro más externo del cerebro.
<b>Entrampar</b>	Meterse en un trampa o atolladero. Engañar artificialmente.
<b>Epéndimo</b>	Del griego <i>ependyma</i> = vestimenta superior. Células de revestimiento de los ventrículos cerebrales y del conducto central de la médula espinal llamado canal ependimario.
<b>Ex vivo</b>	Referente a los experimentos o medidas realizados en o sobre tejidos biológicos de un organismo en un ambiente artificial fuera del organismo con las alteraciones mínimas de las condiciones naturales.
<b>Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)</b>	Familia de proteínas de señalización que se utilizan en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o la totalidad de los animales. Los FGF a menudo son angiogénicos o mitogénicos. Los receptores son tirosincinasas y algunas mutaciones receptoras están asociadas con defectos congénitos hereditarios

---

<b>Factor de crecimiento transformante (TGF)</b>	Corresponde a una familia de proteínas de señalización que se utilizan en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o la totalidad de los animales.
<b>Fenotipo</b>	Características físicas y fisiológicas detectables de una célula u organismos determinadas por su genotipo: también, rasgo específico asociado con un alelo en particular.
<b>Fibronectina</b>	Glicoproteína dimérica de alto peso molecular (440 kDa aprox.) presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos celulares animales compuesta por dos subunidades muy largas unidas por puentes bisulfuro situados cerca del extremo carboxilo. Cada subunidad está formada por una serie de dominios funcionalmente distintos separados por regiones polipeptídicas flexibles. Estos dominios están compuestos por módulos más pequeños que, al repetirse secuencialmente y estar codificados por un exón diferente, sugieren que el exón de la fibronectina se originó por duplicaciones exónicas múltiples. La fibronectina no solo juega un papel importante en la adhesión de las células a la matriz, sino que también actúa como guía de las migraciones celulares que tiene lugar en los embriones de los vertebrados.
<b>Genotipo</b>	Constitución genética completa de una célula individual u organismo, en la que generalmente se destacan alelos particulares en uno o más locus específicos.
<b>Glicoproteínas</b>	Cualquier proteína a la cual están unidas en forma covalente una o más cadenas de oligosacáridos.
<b>Glicosaminoglucanos (GAG)</b>	Largo polímero lineal, altamente cargado, de un disacárido repetido, en el cual un miembro del par suele ser un azúcar ácido (ácido urónico) y el otro es un amino azúcar. Generalmente muchos residuos suelen ser sulfatados.
<b>Graficación</b>	Estudio de algoritmos para el diseño e implementación de representaciones graficas de los datos que permite presentar visualmente la relación matemática o correlación estadística que guardan entre sí.
<b>Hematoma extradural</b>	Hematoma localizado entre la duramadre y la tabla interna del cráneo. Los síntomas empiezan con vómitos, cefalea, éxtasis papilar, rigidez de nuca, convulsiones y hemiplejía. El tratamiento es la craneotomía con el correspondiente vaciado del hematoma y la ligadura de la arteria afectada.
<b>Hematoma subdural</b>	Hematoma localizado en el espacio subdural debido a una hemorragia postraumática en las meninges; produce unos síntomas similares al hematoma extradural. El tratamiento es quirúrgico.
<b>Hemilaminectomía</b>	Intervención quirúrgica que consiste en la extirpación de una lámina ósea en un lado de la columna vertebral, como en los casos de hernia del disco intervertebral.
<b>Inclusión</b>	Método utilizado para endurecer tejidos que consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar a las características del tejido
<b>Integrinas</b>	Familia de proteínas transmembranales heterodiméricas que favorece la adhesión de células a la matriz extracelular o a la superficie de otras células.

---

<b>Intratecal</b>	Que se localiza o se produce dentro de una envoltura, como dentro de las envolturas meníngeas o en el espacio subaracnoideo.
<b>Laminectomia</b>	Operación quirúrgica que pretende descomprimir la médula o enderezarla mediante la resección de una o varias láminas de las vértebras.
<b>Línea celular</b>	Población de células cultivadas, de origen animal o vegetal, que han sufrido una modificación genética que les permite dividirse indefinidamente. Las líneas celulares pueden ser por consecuencia de la transformación viral o química y se dice que son inmortales.
<b>Matriz extracelular (MEC)</b>	Red generalmente insoluble que consiste en polisacáridos, proteínas fibrosas y proteínas adhesivas que son secretadas por las células animales. Provee sostén estructural a los tejidos y puede afectar el desarrollo y las funciones bioquímicas de la célula.
<b>Microglía</b>	Del griego <i>mikros</i> = pequeño y <i>glía</i> = goma. Pequeñas células intersticiales de apoyo no neuronal del sistema nervioso central.
<b>Mielina</b>	Sustancia lipídica que rodea los axones de las neuronas mielínicas. Está formada por fosfolípidos, colesterol y proteínas, y desempeña una función aislante del impulso nervioso. La mielina se mantiene unida al axón gracias a la presencia de las células de Schwann que se disponen enrolladas a su alrededor.
<b>Monómero</b>	Cualquier molécula que puede unirse químicamente con otras del mismo tipo para formar un polímero.
<b>Motivos</b>	En las proteínas, estructura corta conservada, que puede reconocerse por la secuencia primaria de aminoácidos. Por lo general, un motivo es indicativo de una arquitectura tridimensional y se asocia con una propiedad funcional específica. Por ejemplo, un motivo de cremallera de leucina indica la presencia de un dominio de espiral enrollado con capacidad de unirse a ADN.
<b>Nestina</b>	Proteína de filamento intermedio del tipo VI expresada en la mayoría de las células nerviosas, está implicada en el crecimiento radial del axón.
<b>Neurodegenerativo</b>	Que provoca la destrucción o muerte progresiva de las neuronas en sistemas o estructuras nerviosas.
<b>Neurofilamento</b>	Clase de filamento intermedio que se encuentra sólo en las neuronas y que determina el diámetro de los axones.
<b>Neuropilinas</b>	Glicoproteína predominantemente transmembranal, existen dos formas de neuropilinas NPR – 1 y NPR – 2, fungen como correceptores para otra clase de proteínas conocidas como semaforinas. De las semaforinas, NPR – 1 y NPR – 2 son receptores específicos de las semaforinas clase 3 que entre diversas funciones son responsables de la guía de axones en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados.

---

<b>Neuropraxia</b>	Del latín <i>neuralis</i> = nervio y del griego <i>apraxia</i> =falta de acción. Falta de conducción nerviosa son daño estructural.
<b>Neuroprotector</b>	Efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos.
<b>Neurotmesis</b>	Del latín <i>neuralis</i> = nervio; griego <i>tmesis</i> = cortar. Sección parcial o total de un nervio con interrupción del axón, vaina de mielina y elementos del tejido conjuntivo.
<b>Neurotóxicos</b>	Del latín <i>neuralis</i> = nervio; <i>trophe</i> = nutrición. Que se relaciona con los trastornos tróficos de origen nervioso, es decir, que tiene efecto protector o restaurador sobre las células nerviosas.
<b>Oligodendroglia</b>	Del griego <i>oligos</i> = pocos, unos cuantos; <i>dendron</i> = árbol y <i>glía</i> = goma. Células neurogliales con pocas ramificaciones.
<b>Padecimiento</b>	Acción de padecer o sufrir daño, injuria, enfermedad, etc.
<b>Pericarion</b>	Soma o cuerpo celular de la neurona que contiene al núcleo, nucléolo y orgánulos como los cuerpos de Nissl, retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi, mitocondrias y al citoesqueleto.
<b>Piamadre</b>	Del latín <i>pia</i> = tierna, blanda; <i>mater</i> = madre. Capa meníngea más interna que cubre el encéfalo y la médula espinal
<b>Pictórico</b>	Perteneciente o relativo a la pintura.
<b>Plasticidad celular</b>	Capacidad que poseen las células madre de un tejido para producir tipos celulares diferenciados de otro órgano o tejido. Asimismo, ya se ha demostrado que una célula puede diferenciarse en otra y volver a su estado original, debido a que la diferenciación no se basa en etapas irreversibles conducidas por reordenamientos génicos, sino por silenciamientos debido a factores no genéticos determinantes de la ontogenia o por genes silenciados activados.
<b>Presión oncótica</b>	Forma de presión osmótica debida a las proteínas plasmáticas que aparece entre el compartimento vascular e intersticial, presión que suele tender a meter agua en el sistema circulatorio. La presión oncótica también es conocida como presión coloidosmótica. Es la fuerza contraria a la presión hidrostática.
<b>Proteína ácida fibroglial (GFAP)</b>	Proteína fibrosa que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann. Descrita por primera vez en 1971, la GFAP es una proteína de tipo III de los filamentos intermedios codificada por un gen que se encuentra, en humanos, en el cromosoma 17. Su función principal es proteger la rígida organización de la estructura tridimensional interna de los astrocitos del cerebro permitiéndoles, sin embargo, considerable flexibilidad y curvatura. En ciertas células se encuentra estrechamente relacionada con filamentos de vimentina, desmina y periferina, los cuales están implicados en la estructura y función del citoesqueleto.

---

<b>Proteoglicano</b>	Grupo de glicoproteínas que contienen una proteína central a la cual se adhieren uno o más glicosaminoglucanos. Se encuentran en casi todas las matrices extracelulares animales y algunas son proteínas integrales de membrana.
<b>Sinapsis</b>	Del griego <i>sinapsis</i> = unión, conexión o broche. Término que introdujo Sherrington en 1897 para describir la región especializada entre la terminación axónica de una neurona y una neurona adyacente u otra célula excitable a través de la cual se transmiten los impulsos. En una sinapsis química, el impulso es conducido por un neurotransmisor; en una sinapsis eléctrica, la transmisión del impulso tiene lugar a través de las uniones de hendidura que conectan las células presináptica y postsináptica.
<b>Síndrome de Horner</b>	Caída del párpado, contracción de la pupila, retracción del globo ocular y pérdida de la sudación en la cara constituyen el síndrome que describió Johann Fredrich Horner, un oftalmólogo suizo, en 1869. El síndrome se debe a interrupción de las fibras simpáticas descendentes.
<b>Subdural</b>	Dícese de la estructura de un órgano que se halla situado debajo de la duramadre
<b>Toracotomía</b>	Operación que consiste en la abertura de la pared torácica, ya sea con fines exploratorios y de diagnóstico o para efectuar una intervención cardíaca, pulmonar o esofágica.
<b>Tubulina</b>	Familia de proteínas globulares formada por las tubulinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), que comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, aunque su similitud con cualquier otra proteína conocida es mínima. Las tubulinas $\alpha$ y $\beta$ son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la tubulina $\gamma$ es un componente fundamental del centrosoma. Existen asimismo otras variantes menores, que no están presentes en todos los organismos eucariotas, denominadas tubulina-delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ).
<b>Uniones en hendidura</b>	Canal revestido de proteínas que conectan los citoplasmas de células animales adyacentes y permite el pasaje de iones y moléculas pequeñas entre las células.
<b>Vaina de mielina</b>	Membrana celular especializada apilada que forma una capa aislante alrededor de los axones de los vertebrados e incrementa la velocidad de la conducción de los impulsos.

# APÉNDICE.

## A.1. Métodos para el análisis superficial de biomateriales.

Método	Principio	Penetración	Resolución.	Sensibilidad.
<b>Ángulo de contacto (AC)</b>	La energía superficial se estima a partir del mojado de líquido sobre superficies.	3 a 20 Å	1 mm <sup>[a]</sup>	Baja o alta, dependiendo de la composición química.
<b>Espectroscopia electrónica para análisis químico (ESCA o XPS)</b>	Los rayos X producen la emisión de electrones de energía característica	10 a 250 Å	8 a 15 mm	0.1 % [atómica]
<b>Espectroscopia electrónica de Auger <sup>[b]</sup></b>	Un haz de electrones enfocado sobre la superficie produce la emisión de electrones Auger	50 a 100 Å	100 Å	0.1 % [atómica]
<b>Espectroscopia de masa de iones secundarios (SIMS)</b>	Un bombardeo de iones lleva a la emisión de iones secundarios desde la superficie.	10 Å a 1 µm <sup>[c]</sup>	500 Å	Muy alta
<b>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR – FTIR)</b>	La radiación infrarroja es absorbida por vibraciones moleculares excitadas.	1 a 5 µm	10 µm	1 mol%
<b>Microscopía de efecto túnel (STM) <sup>[d]</sup></b>	Medida de la corriente tipo túnel cuántico entre una sonda metálica y una superficie conductora.	5 Å	1 Å	Átomos individuales
<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM, ESEM)</b>	Se mide y visualiza especialmente la emisión de electrones secundarios causada por un haz de electrones enfocado hacia la superficie.	5 Å	40 Å	Alto, no cuantitativo.

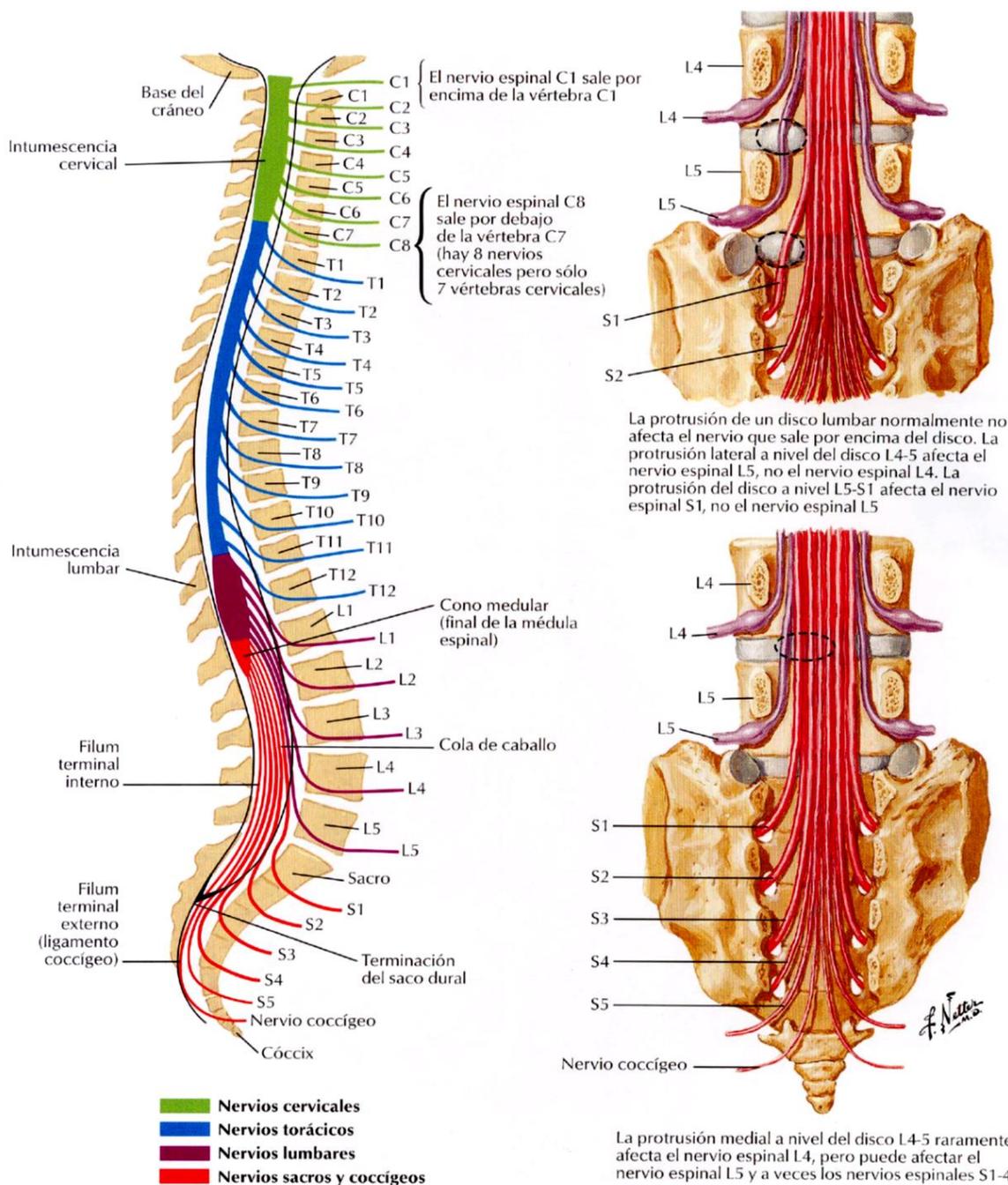
[a] El tamaño de una gota pequeña es de 1mm. Sin embargo, la resolución espacial de la línea interfacial en el borde de la gota es aproximadamente de 0.1 mm.

[b] La espectroscopia electrónica Auger daña la superficie de materiales orgánicos y se emplea usualmente para materiales inorgánicos.

[c] SIMS estático aproximadamente 10 Å; SIMS dinámico hasta 1 m.

[d] Para materiales aislantes se emplea microscopía de fuerza atómica (AFM) que tiene una resolución espacial cercana a la del STM.

## A.2. Pares nerviosos.



### A.3. Escala Basso - Beattie – Bresnahan: Locomoción y funcionalidad en ratas.

Valor	Descripción.
0	Sin movimiento observable en las extremidades posteriores.
1	Ligero movimiento de 1 ó 2 articulaciones, generalmente cadera y/o rodilla.
2	Movimiento extenso en 1 sola articulación o extenso movimiento en 1 articulación y movimiento discreto en otra.
3	Movimiento extenso en 2 articulaciones.
4	Ligero movimiento de las 3 articulaciones de la extremidad.
5	Ligero movimiento de 2 articulaciones y movimiento extenso de la tercera.
6	Movimiento extenso de 3 articulaciones y movimiento discreto de la tercera.
7	Movimiento extenso de las 3 articulaciones de las extremidades posteriores.
8	Arrastre con incapacidad para soportar el tren posterior o colocar la planta de la pata.
9	Colocación de la planta de la pata con soporte del tren posterior por un instante o soporte del tren posterior ocasional, frecuente o consistentemente sin apoyar la planta al caminar.
10	Soporte ocasional del tren posterior dando algunos pasos. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores.
11	Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores.
12	Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. Coordinación ocasional de las extremidades anteriores con las posteriores.

<b>13</b>	Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. Coordinación frecuente de las extremidades anteriores con las posteriores.
<b>14</b>	Soporte consiste en el tren posterior dando pasos con la planta de la pata, coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores y colocación de la pata durante la locomoción predominantemente rotada (interna o externamente) al hacer contacto inicial con la superficie, así como poco antes de terminar o pasos plantares frecuentes, coordinación consistente de los miembros anteriores y posteriores y soporte de peso ocasional en la superficie dorsal de la pata.
<b>15</b>	Soporte del tren posterior consistente y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores sin apoyo del todo correcto durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial.
<b>16</b>	Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y colocación adecuada frecuentemente durante el avance del miembro hacia adelante. Colocación predominante de la pata en paralelo al contacto inicial y rotada al terminar.
<b>17</b>	Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y colocación correcta frecuentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente en paralelo al contacto inicial y al finalizar.
<b>18</b>	Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y apoyo correcto consistentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la pata en paralelo al contacto inicial y rotado al término.
<b>19</b>	Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y apoyo correcto consistentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la pata en paralelo al contacto inicial y al término y la cola abajo la mayor parte o todo el tiempo.
<b>20</b>	Pasos plantares consistentes y marcha coordinada consistentemente, apoyo consistente colocación de la pata predominantemente en paralelo al contacto inicial y al término e inestabilidad del tronco. La cola consistentemente arriba.
<b>21</b>	Pasos plantares consistentes, marcha coordinada, apoyo correcto, colocación de la pata predominantemente en paralelo a través de toda la estancia. Estabilidad consistente del tronco y la cola consistentemente arriba.



## A.5. Solución fijadora de Karnosky.

Para 100 mL

1. Disolver 4 gr de paraformaldehído en 50 ml de agua, agitar y calentar a 60 – 70 °C
2. Añadir 3 a 4 gotas de KOH 1N hasta aclarar la solución.
3. Al llegar a los 70 °C se observará que la disolución, antes turbia, se torna rápidamente transparente.
4. Añadir 10 ml de glutaraldehído al 50%.
5. Aforar a 100 ml con solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH 7.2.
6. Mantener en refrigeración a 4 °C aun en el momento de su utilización.
7. A las 24 horas lavar el material fijado en PBS pH 7.2 realizando un cambio cada media hora hasta completar 5 cambios.
8. Refrigerar el material en PBS hasta máximo por una semana.

NOTA: Se realizará el proceso en campana de extracción para no respirar los vapores que resultan tóxicos.

## A.6. Tinción de Lapham de Floxina - Verde rápido para mielina y fibras gliales

Referencias. (80, 95)

Requerimientos técnicos.

Espesor de corte: 6 a 12 micra.

Soluciones:

**Solución de galocianina**

Sulfato de potasio y cromo 5.0 g

Galocianina 0.15 g

Agua destilada 100.0 mL

Calentar y llevar a ebullición. Hervir por 15 a 20 minutos. Filtrar una vez frío

**Solución de floxina al 0.5%**

Floxina B 0.5 g

Agua destilada 100.0 mL

**Solución de verde rápido al 0.05%**

Verde rápido FCF 0.05 g

Agua destilada 100.0 mL

Procedimiento de tinción.

1. Desparafinar y rehidratar la muestra hasta agua destilada.
2. Sumergir la muestra en solución fresca y filtrada de galocianina, e incubar toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar con agua corriente por 5 minutos y realizar dos cambios en agua destilada.
4. Sumergir por 5 minutos en solución de floxina.
5. Lavar en agua corriente por 3 minutos.
6. Sumergir en ácido fosfotúngstico acuoso al 5% por 1 minuto.
7. Lavar con agua corriente por 3 minutos.
8. Colocar en ácido acético 1% por 2 minutos.
9. Diferenciar por 1 a 2 minutos en alcohol al 80%. Verificar en el microscopio después de 1 minuto. La mielina debe observarse claramente.
10. Colocar en solución de ácido acético 1% por 1 minuto.
11. Sumergir en solución de verde rápido por un minuto.
12. Deshidratar en tres cambios de alcohol al 95% y tres cambios de alcohol absoluto.
13. Limpiar con tres o cuatro cambios de xileno.
14. Montar la preparación.

Resultados:

Mielina	Magenta
Fibras gliales	Verde
Astroцитos	Verde
Núcleo	Negro o azul oscuro
Nucléolo	Usualmente rojo
Colágeno	Verde
Neuronas	Negro
Oligodendrocitos	Rojo

## A.7. Estadísticos de regresión lineal para el ángulo de contacto en la región I.

	P1	P2
Best-fit values ± SE	Perfect line	
Equation	$Y = -8.28 * X + 49.7$	$Y = -5.49 * X + 67.1$
Slope	-8.28	-5.49 ± 0.975
Y-intercept	49.7	67.1 ± 4.29
X-intercept	6	12.2
1/slope	-0.121	-0.182
<b>95% Confidence Intervals</b>		
Slope		-17.9 to 6.9
<b>Goodness of Fit</b>		
R square	1	0.969
Sy.x		4.84
<b>Is slope significantly non-zero?</b>		
F		31.7
DFn, DFd		1, 1
P value		0.112
Deviation from zero?		Not Significant
<b>Runs test</b>		
Points above line		2
Points below line		1
Number of runs		3
P value (runs test)		>0.999
Deviation from linearity		Not Significant
<b>Data</b>		
Number of X values	3	3
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	2	3
Number of missing values	1	0

## A.8. Estadísticos de regresión lineal para el ángulo de contacto en la región II.

Best-fit values ± SE	P1	P2
Equation	$Y = 0.839 * X + 23.3$	$Y = 2.28 * X + 13.6$
Slope	0.839 ± 0.202	2.28 ± 0.481
Y-intercept	23.3 ± 1.83	13.6 ± 4.95
X-intercept	-27.8	-5.95
1/slope	1.19	0.439
<b>95% Confidence Intervals</b>		
Slope	-0.0301 to 1.71	-3.84 to 8.39
<b>Goodness of Fit</b>		
R square	0.896	0.957
Sy.x	1.49	2.04
Is slope significantly non-zero?		
F	17.3	22.4
DFn, DFd	1, 2	1, 1
P value	0.0534	0.1325
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant
<b>Runs test</b>		
Points above line	2	2
Points below line	2	1
Number of runs	3	3
P value (runs test)	0.6667	>0.9999
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant
<b>Data</b>		
Number of X values	4	4
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	4	3
Number of missing values	0	1

### A.9. Estadísticos de regresión lineal para el ángulo de contacto en la región III.

Best-fit values ± SE	P1	P2
Equation	<b>Y = -0.0697*X + 34</b>	<b>Y = 0.078*X + 42.6</b>
Slope	-0.0697 ± 0.0756	0.078 ± 0.0667
Y-intercept	34 ± 1.69	42.6 ± 1.5
X-intercept	488	-546
1/slope	-14.4	12.8
<b>95% Confidence Intervals</b>		
Slope	-0.28 to 0.14	-0.107 to 0.263
<b>Goodness of Fit</b>		
R square	0.175	0.255
Sy.x	1.07	0.941
<b>Is slope significantly non-zero?</b>		
F	0.85	1.37
DFn, DFd	1, 4	1, 4
P value	0.409	0.307
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant
<b>Runs test</b>		
Points above line	4	3
Points below line	2	3
Number of runs	4	4
P value (runs test)	0.8	0.7
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant
<b>Data</b>		
Number of X values	6	6
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	6	6
Number of missing values	0	0

## A.10. Estadísticos de grupos para prueba de concentraciones de albúmina.

Table Analyzed		Dunnet			
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
BBB	22.8	<0.001	****	Yes	
Tx	47.2	0.013	*	Yes	
Interaction: BBB x Tx	11.2	<0.001	***	Yes	
Interaction: BBB x Subjects	0.774				
Interaction: Tx x Subjects	10.8				
Subjects	0.686				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
BBB	247	7	35.2	F (7, 14) = 58.8	P<0.001
Tx	511	3	170	F (3, 6) = 8.75	P=0.013
Interaction: BBB x Tx	122	21	5.8	F (21, 42) = 3.42	P<0.001
Interaction: BBB x Subjects	8.38	14	0.598		
Interaction: Tx x Subjects	117	6	19.5		
Subjects	7.42	2	3.71		
Residual	71.2	42	1.69		

Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
7 vs. LTME	3.31	-0.634 to 7.26	No	ns	0.094			
<b>14 vs. LTME</b>	<b>5.41</b>	<b>1.46 to 9.35</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>	<b>0.013</b>			
21 vs. LTME	-0.0208	-3.97 to 3.93	No	ns	>0.999			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
7 vs. LTME	5.94	2.63	3.31	1.27	24	24	2.6	6
14 vs. LTME	8.03	2.63	5.41	1.27	24	24	4.25	6
21 vs. LTME	2.6	2.63	-0.0208	1.27	24	24	0.0164	6

### A.11. Estadísticos de grupo control sin LTME con microinyección.

Table Analyzed		Control Dunnet			
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
BBB	21.2	<.001	***	Yes	
Tx	37.3	.002	**	Yes	
Interaction: BBB x Tx	26.4	<.001	***	Yes	
Interaction: BBB x Subjects	2.09				
Interaction: Tx x Subjects	3.94				
Subjects	2.16				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
BBB	70.1	7	10	F (7, 14) = 20.3	P<.001
Tx	123	3	41.1	F (3, 6) = 18.9	P=.002
Interaction: BBB x Tx	87.3	21	4.16	F (21, 42) = 7.66	P<.001
Interaction: BBB x Subjects	6.91	14	0.494		
Interaction: Tx x Subjects	13	6	2.17		
Subjects	7.16	2	3.58		
Residual	22.8	42	0.543		

Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
P1 vs. Vehículo	0.0917	-1.23 to 1.41	No	ns	.992			
P2 vs. Vehículo	-0.658	-1.98 to 0.66	No	ns	.358			
<b>RSA vs. Vehículo</b>	<b>-2.72</b>	<b>-4.04 to -1.4</b>	<b>Yes</b>	<b>**</b>	<b>.002</b>			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
P1 vs. Vehículo	20.9	20.8	0.0917	0.425	24	24	0.215	6
P2 vs. Vehículo	20.1	20.8	-0.658	0.425	24	24	1.55	6
RSA vs. Vehículo	18.1	20.8	-2.72	0.425	24	24	6.4	6

## A.12. Estadísticos de grupos con LTME con microinyección.

Table Analyzed		LTME Dunnet			
Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
BBB	15.6	<.001	***	Yes	
Tx	33.2	.002	**	Yes	
Interaction: BBB x Tx	3.99	<.001	***	Yes	
Interaction: BBB x Subjects	1.13				
Interaction: Tx x Subjects	30.7				
Subjects	7.04				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
BBB	1158	7	165	F (7, 35) = 69	P<.001
Tx	2462	5	492	F (5, 25) = 5.41	P=.002
Interaction: BBB x Tx	296	35	8.45	F (35, 175) = 2.38	P<.001
Interaction: BBB x Subjects	83.9	35	2.4		
Interaction: Tx x Subjects	2274	25	91		
Subjects	522	5	104		
Residual	621	175	3.55		

Compare column means (main column effect)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
LTME+RSA vs. LTME	1.19	-4.04 to 6.42	No	ns	.959			
<b>L+P1 vs. LTME</b>	<b>6.29</b>	<b>1.06 to 11.5</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>	<b>.015</b>			
LTME+P1+RSA vs. LTME	-0.833	-6.07 to 4.4	No	ns	.991			
LTME+P2 vs. LTME	-0.615	-5.85 to 4.62	No	ns	.997			
<b>LTME+P2+RSA vs. LTME</b>	<b>5.66</b>	<b>0.424 to 10.9</b>	<b>Yes</b>	<b>*</b>	<b>.031</b>			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
LTME+RSA vs. LTME	6.29	5.1	1.19	1.95	48	48	0.61	25
LTME+P1 vs. LTME	11.4	5.1	6.29	1.95	48	48	3.23	25
LTME+P1+RSAA vs. LTME	4.27	5.1	-0.833	1.95	48	48	0.428	25
LTME+P2 vs. LTME	4.49	5.1	-0.615	1.95	48	48	0.316	25
LTME+P2+RSA vs. LTME	10.8	5.1	5.66	1.95	48	48	2.91	25

### A.13. Composición de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

## CORNING

### Buffered Saline Solutions

#### Formulation

Cat. No.	20-030	20-031	21-030	21-031	55-031	21-040	46-013	46-012
Description	Liquid, 10x	Liquid, 10x	Liquid, 1x	Liquid, 1x	Powder	Liquid, 1x	Liquid, 10x	Liquid, 10x
Units	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
<b>Components</b>								
<i>Inorganic Salts</i>								
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	1.00	--	0.10	--	--	--	--	--
KCl	2.00	2.00	0.20	0.20	0.20	--	2.0	--
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.00	2.00	0.20	0.20	0.20	0.144	2.40	--
MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	1.00	--	0.10	--	--	--	--	--
NaCl	80.00	80.00	8.00	8.00	8.00	9.00	80.00	80.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	11.50	11.50	--	1.15	1.15	0.795	14.40	--
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	--	--	2.1716	--	--	--	--	--
<i>Organic Buffers</i>								
Tris Ultrapure	--	--	--	--	--	--	--	24.2



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00031  
Matrícula: 2113802030

Efecto del tratamiento combinado de albúmina con polímeros de Polipirrol dopado con Yodo sintetizados vía energía de plasma en la recuperación motora después de una lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas Long Evans

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 23 del mes de marzo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA  
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ  
DR. RIGOBERTO GONZALEZ PIÑA  
DR. ANTONIO BUENO NAVA  
DR. PEDRO DIAZ LEYVA



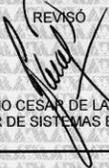

OMAR FELIPE FABELA SANCHEZ  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: OMAR FELIPE FABELA SANCHEZ

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI



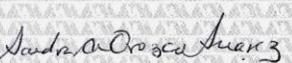
DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE



DR. LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA

VOCAL



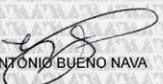
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

VOCAL

CANCELADO

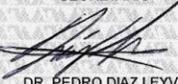
DR. RIGOBERTO GONZALEZ PIÑA

VOCAL



DR. ANTONIO BUENO NAVA

SECRETARIO



DR. PEDRO DIAZ LEYVA